(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 776 408**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/16 (2015.01)
C12N 5/0775 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2008** **E 16182980 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3117828**

(54) Título: **Método de proliferación celular y agente farmacéutico para reparación y regeneración de tejido**

(30) Prioridad:

11.09.2007 JP 2007235436
12.09.2007 JP 2007236499
12.10.2007 JP 2007267211
25.10.2007 JP 2007278083
25.10.2007 JP 2007278049

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.07.2020

(73) Titular/es:

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY (100.0%)
291, Minami 1-jo Nishi 17-chome, Chuo-ku
Sapporo-shi, Hokkaido 060-0061, JP

(72) Inventor/es:

HONMOU, OSAMU y
HOUKIN, KIYOHIRO

(74) Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 776 408 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

Método de proliferación celular y agente farmacéutico para reparación y regeneración de tejido

Campo técnico

La presente invención se refiere a: un método para hacer crecer, rápida y masivamente *ex vivo,* células madre mesenquimatosas humanas recogidas de un sujeto vivo tal como se describe en las reivindicaciones; a células que se han hecho crecer mediante el método; a una preparación farmacéutica para reparación y regeneración de tejido biológico que comprende las células. Este método es adecuado particularmente para autotrasplante de células madre mesenquimatosas y es aplicable particularmente a la reparación y regeneración de un tejido del sistema nervioso.

Técnica anterior

Hasta ahora, la recuperación de las funciones de tejidos nerviosos dañados se ha considerado muy difícil. Sin embargo, en los últimos años se han encontrado neurocitoblastos que conservan la capacidad de crecer de manera autónoma y la pluripotencia en el cerebro adulto. Basándose en este hallazgo, también se ha estudiado activamente la medicina regenerativa en el sistema nervioso central. Se ha pensado que la terapia celular para reponer células dañadas es lo más próximo al uso práctico como medicina regenerativa usando células madre. En la terapia celular, las células proporcionadas por un donante (a continuación en el presente documento, denominadas células de donante) se cultivan, se hacen crecer y/o se induce su diferenciación *ex vivo*. Las células se administran en una forma apropiada a un sujeto vivo como receptor para reponer las células de tejido dañadas del receptor.

Para la enfermedad neurológica cerebral, se ha realizado un intento en modelos de isquemia o traumatismo, en los que se extraen de tejidos células que tienen potencial de diferenciación en células del sistema nervioso, A continuación se cultivan y se trasplantan a un individuo. Por ejemplo, los presentes inventores han descubierto ya que una fracción celular que contiene células capaces de diferenciarse en células neuronales está presente en células de la médula ósea y han demostrado además que el trasplante de estas células a modelos de médula espinal desmielinizada de rata, vuelve a mielinizar los axones desmielinizados (documento de patente 1).

Para usar células de donante en el tratamiento de una enfermedad, particularmente en el tratamiento de una enfermedad que tiene síntomas en la fase aguda, tal como encefalopatía isquémica atribuida a infarto cerebral, es importante hacer crecer las células de donante rápida y masivamente. Se han realizado diversos intentos para hacer crecer células *ex vivo* para mejorar la tasa de supervivencia celular y potenciar la tasa de crecimiento.

Por ejemplo, se usan medios complementados con diversas sustancias que promueven el crecimiento para mejorar la tasa de crecimiento celular. Por ejemplo, el documento de patente 2 divulga que los factores inhibidores de leucocitos aumentan la tasa de crecimiento celular. El documento de patente divulga un medio que contiene albúmina sérica humana recombinante para hacer crecer células hematopoyéticas. El documento de patente 4 divulga un método para cultivar células madre mesenquimatosas en un medio que contiene vitamina C y un factor de crecimiento básico de fibroblastos. También se conoce en la técnica el uso de otros factores de crecimiento (por ejemplo, factores de crecimiento de células epiteliales, factores de crecimiento de células nerviosas, factores de crecimiento de células hepáticas, trombopoyetina e interleucina).

Se han desarrollado también sustratos de cultivo que potencian mucho más la tasa de crecimiento celular. Por ejemplo, el documento de patente 5 divulga un método para cultivar células madre mesenquimatosas en matriz extracelular de membrana basal.

Además, el suero también se usa generalmente como sustancia promotora del crecimiento. Hasta ahora, se ha usado ampliamente un medio complementado con aproximadamente del 10 % al 20 % de suero animal exógeno incluyendo suero fetal bovino (FBS) u otros factores de crecimiento celular en el cultivo de células madre. Sin embargo, las células animales tales como FBS difieren en composición de un lote a otro y también tienen el problema de posible contaminación con patógenos tales como virus o priones.

Para hacer frente a tales problemas, se han desarrollado también medios libres de suero (véanse por ejemplo, los documentos de patente 2 y 3). Sin embargo, el cultivo en tales medios libres de suero apenas produce un crecimiento equivalente al de un medio complementado con suero en las presentes circunstancias.

Por otro lado, en un intento por usar suero humano, se usa suero de adulto humano porque el uso de suero fetal es difícil desde el punto de vista ético (véanse por ejemplo, los documentos de patente 6 a 8). La ventaja del uso de suero de adulto es que puede usarse el propio suero de un individuo del que se recogen las células de donante. El uso de autosuero es muy preferible desde el punto de vista de la compatibilidad y la seguridad.

La desventaja del uso del suero de adulto es una actividad promotora del crecimiento más baja que la obtenida usando, por ejemplo, FBS. El suero de adulto presenta actividad promotora del crecimiento celular insuficiente por sí

mismo y por tanto, requiere inevitablemente adición adicional de FBS (documento de patente 6) o adición de otros factores de crecimiento (documento de patente 7) para obtener un crecimiento equivalente al obtenido usando FBS. Sin embargo, aún cuando se obtienen efectos equivalentes a los obtenidos usando FBS mediante la adición de factores de crecimiento o similares, no puede obtenerse el crecimiento rápido y masivo que es aplicable al tratamiento de enfermedades en fase aguda tal como se describió anteriormente.

Por otro lado, los métodos convencionales para el cultivo/crecimiento de células recogidas de un sujeto vivo comprenden añadir heparina durante la recogida de tejidos o células que contienen componentes sanguíneos de un donante para evitar la coagulación de la sangre (véase por ejemplo, el documento de patente 9 y los documentos no de patente 1 y 2). En un caso típico (por ejemplo, recogida de células de médula ósea para trasplante habitual de médula ósea), la cantidad de heparina administrada es de aproximadamente decenas de U/ml (aproximadamente de 20 a 40 U/ml) con respecto al volumen de la disolución celular. Por ejemplo, el documento de patente 8 divulga la adición, a un fluido de médula ósea, de una disolución heparina/tampón que contiene heparina en el intervalo de aproximadamente de 5 a 15 U/ml. El documento de patente 2 divulga un método, en el que la heparina está contenida además en un medio de cultivo.

La heparina también se usa como ayuda al crecimiento, además de la aplicación para evitar la coagulación de la sangre tal como se describió anteriormente. Por ejemplo, el documento de patente 4 divulga que la heparina tiene el efecto de mejorar la afinidad de un factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFCF) para su receptor. Además, el documento de patente 10 divulga una forma modificada de glucosaminoglucano sulfatado que contiene heparina, como una ayuda para el crecimiento de neurocitoblastos. Sin embargo, incluso estos métodos que usan heparina no pueden alcanzar una tasa de crecimiento suficientemente rápida y masiva en las presentes circunstancias.

Mientras, los sujetos vivos, cuando se lesionan, tienen un mecanismo en el que el sitio de lesión se repara de manera autónoma. Por tanto, puede repararse un determinado grado de lesión sin dejar el daño funcional. Sin embargo, el mecanismo endógeno de reparación no es suficiente para un amplio grado de lesión. En este caso, la recuperación puede retrasarse, o la lesión puede repararse de manera incompleta, dejando daño funcional. Se ha pensado de manera convencional que los tejidos biológicos, particularmente tejidos nerviosos o similares, que reciben tal lesión, son difíciles de reparar. Sin embargo, con el reciente hallazgo de que las células madre tienen pluripotencia, se ha realizado un intento por reponer células dañadas con tales células madre. Por ejemplo, el documento de patente 11 divulga que se administraron células madre mesenquimatosas a ratas modelo de infarto cerebral en la fase aguda de la enfermedad (tras de 3 a 24 horas de inducción de isquemia) y por consiguiente produjeron efectos terapéuticos significativos.

Sin embargo, queda por notificarse un enfoque, que sea eficaz para recuperar funciones perdidas en la fase subaguda o posterior en el que el sitio de lesión se estabilice en cierta medida debido al paso del tiempo desde la lesión.

Documento de patente 1: Documento de patente de WO02/00849A1

Documento de patente 2: Publicación nacional de solicitud de patente internacional n.º 2002-518990

Documento de patente 3: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2005-204539

Documento de patente 4: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2006-136281

Documento de patente 5: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2003-52360

Documento de patente 6: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 10-179148

Documento de patente 7: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º. 2003-235548

Documento de patente 8: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º. 2006-55106

Documento de patente 9: Documento de patente de WO01/48147A1

Documento de patente 10: Patente japonesa abierta a consulta por el público n.º 2005-218308

Documento de patente 11: Documento de patente de WO2005/007176

Documento no de patente 1: F. Takaku, “Manual of Bone Marrow Transplantation”, primera edición, CHUGAI-IGAKUSHA, 1996, pág. 86

Documento no de patente 2: Y. Miura, ed., “Method of Hematopoietic Stem Cell Culture” primera impresión de la 2ª edición revisada, CHUGAI-IGAKUSHA, 1989, pág. 38

Divulgación de la invención

Problemas que ha de resolver la invención

Por tanto, un objeto de la presente invención es resolver los problemas de las técnicas convencionales en hacer crecer células ex *vivo* para trasplante celular y para hacer crecer células rápida y masivamente a una tasa de crecimiento más alta que la de los métodos convencionales. Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una preparación altamente práctica para ayudar en la reparación de tejido, usando las células crecidas. Esta preparación tiene efectos terapéuticos aún cuando se administra en la fase de la lesión subaguda o posterior.

Medios para resolver los problemas

Para alcanzar el objeto, los presentes inventores han examinado diversas condiciones y procedimientos para el cultivo celular y, en el proceso, han realizado estudios centrándose en la heparina usada habitualmente con el propósito de evitar la coagulación de la sangre. Por consiguiente, los presentes inventores han encontrado que la heparina tiene efectos inhibidores significativos sobre el crecimiento celular. Como resultado de estudios adicionales, los presentes inventores han encontrado que siempre que las células se cultivan en condiciones que no implican contacto con heparina, pueden obtenerse células que tienen una eficacia de crecimiento excelente (crecen rápidamente) incluso en un método de cultivo que usa suero alogénico (incluyendo autólogo) en vez de FBS, y que las células obtenidas son seguras con una potencia de diferenciación alta. Basándose en estos hallazgos, se ha completado la presente invención.

Específicamente, la presente invención se refiere a un método para hacer crecer células madre mesenquimatosas humanas en una muestra recogida de un sujeto vivo cultivando las células en un medio, comprendiendo el método cultivar las células, sin contacto sustancial con un anticoagulante, en un medio que contiene suero alogénico tal como se define adicionalmente en la reivindicación 1. En este contexto, se prefiere que el suero alogénico se determine como negativo para un marcador tumoral y/o un factor infeccioso. Además, se prefiere que el suero alogénico sea autosuero del sujeto del que se recogen las células.

En este contexto, los ejemplos del marcador tumoral sérico pueden incluir ferritina, CEA, AFP, BFP, CA125, CA15-3, CA19-9, CA72-4, STN, DUPAN-2, SLX, ST-439, SPAN-1, SCC, PSA, G-seminoproteína, TPA, CYFRA, PAP, NSE, péptido C, PIVKA, Pro-GRP, HCGβ, elastasa, β2 microglobulina, S-NTX, un anticuerpo anti-p53 y HER2. Los ejemplos de factores infecciosos pueden incluir VIH, ATL, HB, HC, sífilis y parvovirus humano B19.

Además, la presente invención se refiere al método, en el que la cantidad del anticoagulante añadido a la muestra recogida es menos de 0,2 U/ml con respecto al volumen de la muestra.

Además, la presente invención se refiere al método, en el que la cantidad del anticoagulante en el medio al inicio del cultivo es menos de 0,02 U/ml.

Además, la presente invención se refiere al método de crecimiento celular, en el que el anticoagulante es heparina, un derivado de heparina o una sal de la misma.

La presente invención se refiere al método, en el que se hacen crecer las células en un medio que contiene suero.

Además, la presente invención se refiere al método, en el que se hacen crecer las células en un medio que contiene suero de un individuo animal de la misma especie que la del animal del que se derivan las células.

Además, la presente invención se refiere al método, en el que se hacen crecer las células en un medio que contiene autosuero.

La presente invención también se refiere al método, en el que el medio tiene un contenido en suero del 1 al 20 % en volumen.

La presente invención se refiere al método, en el que se hacen crecer células madre.

Además, la presente invención se refiere al método, en el que se hacen crecer células madre mesenquimatosas.

Además, la presente invención se refiere al método, en el que se hacen crecer células humanas.

La presente invención se refiere al método, en el que se hacen crecer las células madre en un estado indiferenciado.

La presente invención también se refiere al método, en el que las células madre mesenquimatosas se subcultivan en el momento en que la densidad de las células en el medio alcanza las 5.500 células/cm^2 o más.

Además, la presente invención se refiere al método, en el que se reemplaza el medio al menos una vez a la semana.

La presente invención también se refiere al método, en el que se repite el subcultivo hasta que el número total de células alcanza las 100.000.000 células o más.

La presente memoria descriptiva describe células humanas cultivadas aisladas cultivadas por cualquiera de los métodos, caracterizadas porque las células están libres de expresión de CD24.

La presente memoria descriptiva describe células humanas cultivadas aisladas cultivadas por cualquiera de los métodos, caracterizadas porque las células tienen expresión de al menos el 90 % de antígenos CD en un grupo positivo descrito en la tabla 1 están libres de expresión de al menos el 90 % de antígenos CD en un grupo negativo descrito en la misma.

Las células se caracterizan además porque las células están libres de expresión aberrante de todos los diversos genes relacionados con cáncer cuya expresión no es preferible en humanos, por ejemplo, EWI-FLI-1, FUS-CHOP, EWS-ATF1, SYTSSX1, PDGFA, FLI-1, FEV, ATF-1, WT1, NR4A3, CHOP/DDIT3, FUS/TLS, BBF2H7, CHOP, MDM2, CDK4, HGFR, c-met, PDGFα, HGF, GFRA1, FASN, HMGCR, RGS2, PPARγ, YAP, BIRC2, lumican, caldesmón, ALCAM, Jam-2, Jam- 3, cadherina II, DKK1, Wnt, nucleostemina, neurofibromina, RB, CDK4, p16, MYCN, telómero, hTERT, ALT, Ras, TK-R, CD90, CD105, CD133, VEGFR2, CD99, ets, ERG, ETV1, FEV, ETV4, MYC, EAT-2, MMP-3, FRINGE, ID2, CCND1, TGFBR2, CDKNIA, p57, p19, p16, p53, IGF-1, c-myc, p21, ciclina D1, y p21. Esta expresión aberrante significa una expresión significativamente mayor que el nivel de expresión correspondiente en individuos sanos.

La presente memoria descriptiva describe un método para producir una preparación farmacéutica para reparación/regeneración de tejido usando las células.

Además, la presente invención se refiere a una preparación farmacéutica para reparación/regeneración de tejido que comprende las células tal como se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a la preparación farmacéutica para ayudar en la reparación de un sitio de lesión o para ayudar en la reparación de un sitio envejecido atribuido al envejecimiento, en la que las células son células madre mesenquimatosas, y la preparación farmacéutica se administra por vía intravenosa, mediante punción lumbar, por vía manera intracerebral, por vía intracerebroventricular, de manera local o por vía intraarterial. El tejido no está particularmente limitado y puede ejemplificarse mediante tejidos del sistema nervioso incluyendo cerebro o médula espinal, riñón, páncreas, hígado, intestino, estómago, órganos digestivos, pulmón, corazón, bazo, vasos sanguíneos, sangre, piel, hueso, cartílago, dientes y próstata. Las células son preferentemente células autólogas.

En una realización preferible, la preparación farmacéutica para reparación/regeneración de tejido de la presente invención se administra en la fase subaguda o posterior de la enfermedad o el trastorno y ayuda en la reparación de un sitio de lesión mediante secreción de citocinas, angiogénesis y/o regeneración nerviosa.

En una realización, el sitio de lesión es el riñón, y que la preparación farmacéutica promueve la reparación del sitio de lesión mejorando el valor de BUN y/o el valor de creatinina.

En una realización, el sitio de lesión es el páncreas, y que la preparación farmacéutica promueve la reparación del sitio de lesión mejorando la glucemia, la concentración sérica de Glu A1 y/o la concentración sérica de HbA1C.

En una realización, el sitio de lesión es el corazón, y que la preparación farmacéutica promueve la reparación del sitio de lesión mejorando la concentración sérica de prostaglandina-D sintasa y/o la concentración sérica de homocisteína.

En una realización, el sitio de lesión es el hígado, y que la preparación farmacéutica promueve la reparación del sitio de lesión mejorando el valor de GOT, el valor de GPT y/o el valor de γ-GTP.

En una realización, el sitio de lesión es el cerebro, y que la preparación farmacéutica puede tratar la afasia o demencia promoviendo la mejora en el valor de SLTA que sirve como índice para la afasia y/o el valor de WAIS-R que sirve como índice para la recuperación intelectual.

En una realización, el sitio de lesión es la próstata, y que la preparación farmacéutica promueve la reparación del sitio de lesión mejorando el valor de PSA.

Los ejemplos de la enfermedad o el trastorno elegido como diana por la preparación farmacéutica para reparación/regeneración de tejido de la presente invención pueden incluir específicamente, pero no se limitan a, daño renal, daño hepático, trastorno pancreático incluyendo diabetes mellitus, hiperplasia prostática benigna, hiperlipidemia, disfunción cerebral mayor incluyendo afasia y demencia, encefalopatía tras reanimación, enfermedad cardiaca y lesión de médula espinal.

La presente memoria descriptiva describe un kit para preparar las células tal como se describe en el presente documento, comprendiendo el kit un recipiente lleno con un medio caracterizado porque contiene un anticoagulante en una cantidad menor de 0,5 U/ml. El kit puede comprender otros reactivos, instrumentos o materiales necesarios para preparar las células. Por ejemplo, la heparina se usa como anticoagulante, si lo hay, en el kit.

Además, la presente memoria descriptiva describe terapia celular para reparación/regeneración de tejido que comprende las etapas de: cultivar, mediante el método de la presente invención, células aisladas de un sujeto; examinar las células obtenidas en la etapa anterior, para determinar su expresión de genes relacionados con cáncer; y administrar al sujeto células que se confirmó en el examen que eran seguras. En este contexto, los ejemplos de los genes relacionados con cáncer que van a examinarse pueden incluir los facilitados a modo de ejemplo anteriormente.

En un aspecto preferible, la terapia celular es un tratamiento de la enfermedad neurológica isquémica en el que el tejido es un tejido del sistema nervioso, y las células son células madre mesenquimatosas autólogas y se administran por vía intravenosa, mediante punción lumbar, por vía intracerebral, por vía intracerebroventricular o por vía intraarterial.

Ventajas de la invención

La presente invención consigue una mejora significativa en la tasa de crecimiento incluso usando en cultivo suero alogénico (por ejemplo, autosuero de un sujeto del que se recogen células) en vez de suero exógeno (FBS), aún cuando se añade un anticoagulante considerado convencionalmente esencial o útil para el crecimiento celular en una cantidad traza o está sustancialmente ausente. Además, según la presente invención, se obtienen células que tienen una eficacia de crecimiento excelente (crecen rápidamente). Estos efectos sorprendentes eran totalmente inesperados a partir del conocimiento convencional. Las células obtenidas mediante el método de cultivo libre de autosuero son mucho más excelentes en seguridad y potencia de diferenciación que las obtenidas mediante los métodos de cultivo convencionales que usan FBS.

Una preparación farmacéutica de la presente invención tiene efectos terapéuticos aún cuando se administra en la fase subaguda o posterior de la enfermedad, en la que se ha supuesto que su administración es ineficaz. Por tanto, las células que van a administrarse no tienen que prepararse antes del desarrollo de la enfermedad y solo es necesario recogerlas de un sujeto tras el desarrollo y cultivarlas. Por tanto, la preparación farmacéutica de la presente invención puede reducir drásticamente la carga del sujeto. Además, la preparación farmacéutica de la presente invención puede ayudar, mediante inyección intravenosa, en la reparación de un sitio de lesión arbitrario en el cuerpo y por tanto, es menos invasiva para el sujeto. Además, la preparación farmacéutica de la presente invención puede administrarse en una sala de curas habitual o similar, sin cirugía y por tanto, puede reducir la carga de donantes médicos y el coste médico. Además, la preparación farmacéutica de la presente invención tiene efectos de reparación-ayuda en una pluralidad de tejidos diferentes y por tanto es aplicable en un intervalo más amplio. En particular, la preparación farmacéutica de la presente invención puede tratar simultánea y eficazmente una pluralidad de diferentes sitios de lesión en el sujeto.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra el crecimiento de células madre mesenquimatosas humanas cuando la cantidad de heparina añadida a un fluido de médula ósea fue de 0,1 U/ml (♦) o 267 U/ml (■);

la figura 2 es una gráfica que muestra el número de células tras 4 días en cultivo cuando se añadió una cantidad traza (izquierda) o 2 ml (derecha) de heparina al fluido de médula ósea. El número de células fue aproximadamente 40 veces mayor por la adición de trazas de heparina;

la figura 3 es una gráfica que muestra un crecimiento de célula madre mesenquimatosa en un medio complementado con suero de adulto humano (♦) o FBS (■) cuando la cantidad de heparina añadida fue de 0,1 U/ml;

la figura 4 es una gráfica que muestra la tasa de crecimiento cuando se cultivaron células madre mesenquimatosas de rata en un medio que contiene el 10 % de FBS complementado con cantidades variables de heparina (1 U/ml, 10 U/ml, 100 U/ml y 1000 U/ml en este orden de arriba abajo);

la figura 5 es una gráfica que muestra la tasa de crecimiento cuando se cultivaron células madre mesenquimatosas de rata en un medio complementado con heparina (♦) o cuando se añadió la misma cantidad de esa heparina a un fluido de médula ósea, seguido por cultivo en un medio (■);

la figura 6 es una gráfica que muestra el crecimiento de células madre mesenquimatosas humanas en un medio αMEM complementado con o bien autosuero de adulto humano (línea continua) o bien FBS (línea discontinua) cuando la cantidad de heparina añadida fue de 0,1 U/ml;

la figura 7 es una gráfica que muestra el crecimiento de células madre mesenquimatosas humanas obtenido

mediante la adición de glutamina (♦) o en la ausencia de glutamina (■) cuando la cantidad de heparina añadida fue menor de 0,1 U/ml;

la figura 8 es una gráfica que muestra la tasa de crecimiento cuando se cultivaron células madre mesenquimatosas de rata no tratadas con heparina (♦), tratadas con heparina (■) o tratadas con heparina+protamina (▲) en un medio que contiene FBS;

la figura 9 es un diagrama que muestra el mecanismo terapéutico de una preparación farmacéutica de la presente invención. La ordenada representa la gravedad de los síntomas. La abscisa representa el tiempo transcurrido desde el desarrollo. La flecha representa el momento de la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención. La curva superior situada en el lado derecho de la flecha representa cambios en los síntomas de un sujeto que recibió la administración de la preparación. La curva inferior representa cambios en los síntomas de un sujeto que no recibió la administración;

la figura 10 es una imagen IRM del cerebro de un paciente con enfermedad neurológica isquémica antes de la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención (izquierda) y tras 2 semanas de administración (derecha). El sitio de lesión se indica en la parte blanca;

la figura 11 es una gráfica que muestra cambios en el nivel de infarto cerebral (escala NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale (escala de accidente cerebrovascular de los institutos nacionales de salud) (●), escala JSS: Japan Stroke Scale (escala de accidente cerebrovascular japonesa) (■) y escala MRS: Modified Ranking Scale (escala de clasificación modificada) (▲)) de un paciente con enfermedad neurológica isquémica durante el periodo que se centra en la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención. La flecha representa el momento de la administración de las células;

la figura 12 es una imagen termográfica de un paciente con enfermedad neurológica isquémica antes de la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención (izquierda) y tras 1 semana de administración (derecha). La región de color oscuro que representa una alta temperatura se redujo significativamente tras 1 semana de administración;

la figura 13 es una gráfica que muestra cambios en la glucemia (BS: ♦), la concentración sérica de Glu A1 (■) y la concentración sérica de HbA1C (▲) de un paciente con diabetes mellitus antes y tras la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención. Las ordenadas izquierda y derecha representan mg/dl y %, respectivamente. La abscisa representa una fecha con el día de la administración como día 0. La flecha representa el momento de la administración de las células (la preparación farmacéutica de la presente invención);

la figura 14 es una gráfica que muestra cambios en el valor de PSA de un paciente con hiperplasia prostática benigna antes y tras la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención. La flecha representa el momento de la administración de las células (la preparación farmacéutica de la presente invención);

la figura 15 es una gráfica que muestra cambios en los valores de γ-GTP (izquierda), GOT (derecha: ♦) y GPT (derecha: ■) de un paciente con daño hepático antes y tras la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención. La flecha representa el momento de la administración de las células (la preparación farmacéutica de la presente invención);

la figura 16 es una gráfica que muestra cambios en el valor de β2-microglobulina de un paciente con daño renal antes y tras la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención. La flecha representa el momento de la administración de las células (la preparación farmacéutica de la presente invención);

la figura 17 es una gráfica que muestra cambios en la grasa neutra de un paciente con hiperlipidemia antes y tras la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención. La flecha representa el momento de la administración de las células (la preparación farmacéutica de la presente invención);

la figura 18 es una gráfica que muestra cambios en los resultados de las pruebas SLTA y WAIS-R de un paciente con disfunción cerebral mayor (demencia y afasia) antes y tras la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención;

la figura 19 muestra los resultados de comparar los efectos terapéuticos provocados por la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención en modelos de infarto cerebral en rata, en la que se realizó la comparación entre grupos a partir de los aspectos de IRM y angiogénesis. En el diagrama, las barras representan (i) un grupo sin trasplante, (ii) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células ($1{,}0x10^6$), (iii) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células transfectadas con el gen de angiopoyetina ($1{,}0x10^6$), (iv) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células transfectadas con el gen de VEGF ($1{,}0x10^6$) y (v) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células transfectadas con el gen de angiopoyetina/VEGF ($1{,}0x10^6$) de izquierda a derecha: * $p<0{,}05$, ** $p<0{,}01$;

la figura 20 muestra los resultados de comparar los efectos terapéuticos provocados por la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención en modelos de infarto cerebral en rata, en la que se realizó la comparación entre grupos a partir de aspectos de comportamiento. En el diagrama, las barras representan (i) un grupo sin trasplante, (ii) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células ($1{,}0x10^6$), (iii) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células transfectadas con el gen de angiopoyetina ($1{,}0x10^6$), (iv) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células transfectadas con el gen de VEGF ($1{,}0x10^6$) y (v) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células transfectadas con el gen de angiopoyetina/VEGF ($1{,}0x10^6$) de izquierda a derecha: * $p<0{,}05$, ** $p<0{,}01$;

la figura 21 muestra los resultados de evaluar los efectos terapéuticos provocados por la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención en modelos de parada cardiorrespiratoria en rata (encefalopatía tras reanimación), en la que se realizó la evaluación basándose en el número de células positivas para Túnel (figura 21A) y el número de células neuronales (figura 21B). En el diagrama, las barras izquierda y derecha representan un grupo de control y un grupo al que se le administraron células, respectivamente: * $p<0{,}05$;

la figura 22 muestra los resultados de evaluar los efectos terapéuticos provocados por la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención en modelos de parada cardiorrespiratoria en rata, en la que se realizó la evaluación según la prueba del laberinto de agua de Morris (* $p<0{,}05$); y

la figura 23 es una gráfica que muestra los resultados de evaluar la recuperación en la función motora de ratas modelo con lesión en la medula espinal trasplantadas con células madre mesenquimatosas humanas según la presente invención, en la que se realizó la evaluación según la prueba de cinta rodante. En el diagrama, las barras representan un trasplante tras 6 horas, 1 día, 3 días, 7 días y 14 días de izquierda a derecha.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, se describirá en detalle un método de crecimiento celular según la presente invención.

El método de la presente invención es un método para hacer crecer células en una muestra recogida de un sujeto vivo cultivando las células en un medio, estando caracterizado el método porque comprende cultivar las células, sin contacto sustancial con un anticoagulante, en un medio que contiene suero alogénico tal como se define adicionalmente en la reivindicación 1. En este contexto, se prefiere que el suero alogénico se determine como negativo para un marcador tumoral y/o un factor infeccioso. Además, se prefiere que el suero alogénico sea autosuero del sujeto del que se recogen las células.

En este contexto, los ejemplos del marcador tumoral sérico que va a examinarse en la presente invención pueden incluir ferritina, CEA, AFP, BFP, CA125, CA15-3, CA19-9, CA72-4, STN, DUPAN-2, SLX, ST-439, SPAN-1, SCC, PSA, G-seminoproteína, TPA, CYFRA, PAP, NSE, péptido C, PIVKA, Pro-GRP, HCGβ, elastasa, β2 microglobulina, S-NTX, un anticuerpo anti-p53 y HER2. Los ejemplos de factores infecciosos pueden incluir HIV, ATL, HB, HC, sífilis y parvovirus humano B19.

La muestra usada en la presente invención es un fluido corporal y/o un tejido que contiene células que tienen la capacidad de crecer y/o son útiles para la reparación/regeneración de tejido. Los ejemplos de los mismos incluyen: fluidos corporales tales como fluido de médula ósea, sangre (sangre periférica o sangre del cordón umbilical) y linfa; tejidos tales como tejidos musculares, tejidos óseos, piel, tejidos linfoides, canales vasculares y órganos digestivos; y embriones (a excepción de embriones humanos). La muestra recogida de un sujeto vivo se somete como muestra completa o, si es necesario, tras tratamiento (por ejemplo, retirada de componentes innecesarios, purificación de una fracción celular particular y tratamiento enzimático) al método de crecimiento según la presente invención.

En la presente memoria descriptiva, la expresión “sin contacto sustancial (de las células) con un anticoagulante” significa que el anticoagulante se usa en una cantidad sustancialmente disminuida en cualquier momento desde la recogida de las células hasta el periodo de cultivo completo. Por ejemplo, esto significa un estado obtenido cuando: el anticoagulante se añade hasta el grado en el que la pared interna de un recipiente para recogida de células (tubo de recogida de sangre, etc.) se humedece con una disolución de anticoagulante; no se añade anticoagulante; o el anticoagulante en la muestra se retira sustancialmente antes del inicio del cultivo.

Para obtener crecimiento celular más rápido y masivo, se prefiere que la cantidad del anticoagulante añadido durante la recogida de la muestra fuese pequeña. Para evitar la coagulación, se trasladan inmediatamente las células recogidas (por ejemplo, en el plazo de 30 minutos) tras la recogida a la etapa de cultivo. Más preferentemente, se evita el contacto sustancial de las células con el anticoagulante. Estos procedimientos producen una tasa de crecimiento sorprendentemente alta, que es de 3 a 100 veces más alta que una convencional.

En un aspecto preferible de la presente invención, la cantidad del anticoagulante añadido a la muestra recogida de un sujeto vivo (es decir, colocada previamente en un tubo de recogida de sangre para contener la muestra recogida) es menos de 0,2 U/ml, con respecto al volumen de la muestra.

La cantidad del anticoagulante presente en el medio durante el cultivo de las células en la muestra recogida de un sujeto vivo es menos de 0,02 U/ml, con respecto al volumen del medio. Más específicamente, la cantidad del anticoagulante añadido al tubo de recogida de sangre para recogida de muestras se reduce de antemano y/o la cantidad del anticoagulante añadido al medio se ajusta de manera que la cantidad del anticoagulante al inicio del cultivo es menos de 0,5 U/ml con respecto al volumen del medio.

Además, en la presente memoria descriptiva, el término “anticoagulante” se refiere a una sustancia que, cuando está presente en el fluido corporal o el medio, interacciona uniéndose a la superficie de la célula con proteínas de la matriz extracelular lo que tiene efectos de anti-coagulación de la sangre e inhibe la adhesión entre las células y la matriz extracelular, entre las células, o entre las células y los sustratos. Por ejemplo, se usan normalmente heparina y un derivado de heparina (por ejemplo, glucosaminoglucano que puede obtenerse por desulfatación en la posición 6 de la D-glucosamina que constituye la heparina; divulgado en la patente japonesa abierta a consulta por el público n.º. 2005-218308A), o una sal de la misma.

En el método de la presente invención, el medio para crecimiento celular no está particularmente limitado siempre que el medio se use habitualmente en el campo del cultivo celular. Para obtener crecimiento más rápido y masivo, es preferible un medio que contiene suero. El medio que contiene suero usado se basa en un medio convencional tal como se describe a continuación en otros párrafos en el presente documento y se prepara añadiendo suero en una cantidad menor del 12 % al medio. Es más preferible la cantidad más pequeña de suero teniendo en cuenta la carga de un individuo como un donante de suero. La cantidad del suero es preferentemente del 1 % al 20 % en volumen, más preferentemente del 3 al 12 %, incluso más preferentemente del 5 al 10 %, teniendo en cuenta el intervalo que produce el efecto deseado de promover rápidamente el crecimiento celular.

En el método de la presente invención, el suero usado es suero de un humano y suero de un individuo del que derivan las células (autosuero). Sin embargo, cuando las células que van a cultivarse son células humanas, puede ser difícil recoger el autosuero. En un caso de este tipo, siempre que las células se cultiven sin contacto sustancial con el coagulante, puede conseguirse una elevada eficacia de crecimiento incluso usando suero de otro individuo de la misma especie que el humano (suero alogénico). Los efectos de la presente invención provocados por la ausencia del anticoagulante se obtienen más significativamente usando suero humano que usando, por ejemplo, FBS. El suero puede ser suero derivado de sangre periférica o puede ser suero derivado de la sangre cordón umbilical.

Las células que van a hacerse crecer mediante el método de la presente invención solo necesitan ser células que se preparan a partir de una muestra que contiene componentes sanguíneos y se cultivan por adhesión. Los ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a: células madre somáticas tales como células mesenquimatosas, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, células madre de la sangre del cordón umbilical, células madre corneales, células madre hepáticas y células madre pancreáticas; monocitos de células madre embrionarias (excepto embriones humanos) tales como células madre fetales; y osteoblastos, fibroblastos, células de ligamento, células epiteliales y células endoteliales vasculares.

En un aspecto, el método de la presente invención es adecuado para el crecimiento de células madre y se usa, por ejemplo, para hacer crecer células madre mesenquimatosas.

Las células madre mesenquimatosas son células madre que están presentes en una cantidad traza en células intersticiales en tejidos mesenquimatosos y tienen pluripotencia y capacidad de autorreplicarse. Se ha encontrado en los últimos años que las células no solo se diferencian en células del tejido conjuntivo tales como osteocitos, condrocitos y adipocitos sino que también tienen potencia de diferenciación en células neuronales o células miocárdicas.

En un aspecto, el método de la presente invención puede usarse para hacer crecer células humanas.

En otro aspecto de la presente invención, las células que se hacen crecer pueden ser células de animales distintos de humanos (por ejemplo: roedores tales como ratones, ratas, cobayas y hámsteres; primates tales como chimpancés; animales del orden *Artiodactyla* tales como vacas, cabras y ovejas; animales del orden *Perissodactyla* tales como caballos; y conejos, perros y gatos).

Además, en un aspecto del método de la presente invención, las células madre pueden hacerse crecer en un estado indiferenciado.

En general, las células madre en un estado indiferenciado tienen una tasa de crecimiento mayor y una tasa de supervivencia mayor tras su introducción en sujetos vivos. Por ejemplo, para el tratamiento de la encefalopatía isquémica, que requiere un crecimiento celular rápido y masivo, pueden hacerse crecer las células madre recogidas hasta el número necesario en un periodo de tiempo corto haciéndolas crecer en un estado indiferenciado.

De forma alternativa, cuando se desea células diferenciadas en una especie celular dada, pueden hacerse crecer células madre o blastocitos masivamente en un estado indiferenciado y posteriormente inducirse a diferenciarse en

la especie celular deseada, por ejemplo, mediante la adición de un factor de crecimiento conocido que induce tal diferenciación o mediante la transfección de un gen que tiene tales propiedades, para obtener una gran cantidad de células diferenciadas.

En un aspecto de la presente invención, se prefiere que las células madre mesenquimatosas se subcultiven en el momento en que la densidad de las células en el medio alcanza las 5.500 células/cm^2 o más.

La densidad de las células en el medio influye en las propiedades de la célula y en la dirección de diferenciación. Por ejemplo, en el cultivo de las células madre mesenquimatosas, las propiedades de las células se alteran cuando la densidad de las células en el medio supera las 8.500 células/cm^2. Por tanto, se prefiere que las células se subcultiven a una densidad celular de 8.500 células/cm^2 o menos como máximo, más preferentemente, en el momento en que la densidad celular alcanza las 5.500 células/cm^2 o más.

Además, en un aspecto preferible de la presente invención, se reemplaza el medio al menos una vez a la semana.

Se requiere el reemplazo del medio para suministrar un nutriente, un factor de crecimiento, una sustancia promotora del crecimiento y similares necesarios para el crecimiento y el cultivo celular y para retirar productos de desecho tales como el ácido láctico formado por el metabolismo celular y mantener de ese modo el pH del medio a un nivel constante. El reemplazo del medio se realiza con un periodo seleccionado dependiendo del tipo de las células, las condiciones de cultivo, etc. En particular, cuando se usa un medio que contiene suero humano, son deseables menos reemplazos de medio teniendo en cuenta la carga del donante de suero. Por ejemplo, cuando se cultivan las células madre mesenquimatosas mediante el método de la presente invención, el reemplazo del medio se realiza al menos una vez a la semana, más preferentemente de una a dos veces a la semana. El método de la presente invención reduce el periodo de cultivo requerido para obtener el número de células necesario. Por tanto, puede reducirse la cantidad de suero que se usa mediante el reemplazo del medio.

En un aspecto preferible del método de la presente invención, el subcultivo puede repetirse hasta que el número total de células alcanza 100.000.000 células o más.

El cultivo celular usando el método de la presente invención produce una tasa de crecimiento de 3 a 100 veces mayor que la habitual. Por tanto, pueden obtenerse las células masivamente en un corto periodo. El número necesario de células puede diferir dependiendo del propósito de uso de las células. Por ejemplo, se piensa que el número de células madre mesenquimatosas que se requiere para trasplante para el tratamiento de la encefalopatía isquémica atribuida a infarto cerebral es de 10.000.000 de células o más. El uso del método de la presente invención puede ofrecer normalmente 10.000.000 de células madre mesenquimatosas en 12 días. Hasta ahora no se ha conseguido un crecimiento celular tan rápido y se ha conseguido por primera vez mediante el método de la presente invención. Además, las propias células obtenidas mediante este método tienen una eficacia de crecimiento excelente. Es sorprendente para los expertos en la técnica que el cultivo en un medio que contiene suero sustancialmente libre de heparina pueda ofrecer células que tienen crecimiento celular tan rápido o una eficacia de crecimiento alta (crecimiento rápido).

Las células obtenidas mediante el método de la presente invención son seguras con una potencia de diferenciación alta. Los presentes inventores designaron las células como “células madre somáticas fundamentales”. Las “células madre somáticas fundamentales” obtenidas mediante el método de la presente invención contienen genes particulares con niveles de expresión diferentes (la presencia o ausencia de expresión o expresión reducida/aumentada) de las células obtenidas mediante cultivo usando suero exógeno (por ejemplo, FBS).

Por ejemplo, la tabla 1 muestra el grupo de antígenos de la superficie celular (antígenos CD) expresados en las células cultivadas en autosuero y el grupo de antígenos CD no expresados en las células madre cultivadas en autosuero. Las células obtenidas mediante el método de la presente invención se caracterizan porque al menos el 90 % de los antígenos CD se expresan en un grupo positivo descrito en la tabla 1 y al menos el 90 % de los antígenos CD en un grupo negativo no se expresan en las células. Las células obtenidas mediante el método de la presente invención se caracterizan porque no se expresa el marcador de diferenciación CD 24 expresado en células cultivadas en suero exógeno (por ejemplo, FBS). Esto muestra que las células según la presente invención mantienen un estado más indiferenciado.

La tabla 3 muestra citocinas que presentaron expresión aumentada o disminuida en común en los 5 casos. Además, la tabla 4 muestra un grupo de genes cuyo nivel de expresión difirió en dos veces o más en común en los 5 casos. Tal como se muestra en estas tablas, se expresan una serie de factores de crecimiento en las células obtenidas mediante el método de la presente invención, y, particularmente para EGF, su nivel de expresión es mayor que en un método de cultivo que usa suero exógeno (por ejemplo, FBS). Esto sugiere probablemente la causa para la ventaja de que las células de la presente invención crezcan.

Además, la tabla 2 muestra factores relacionados con factores de crecimiento que presentaron expresión aumentada o disminuida en común en los 5 casos que implican las células cultivadas en FBS y las células cultivadas en autosuero. Tal como se muestra en esta tabla, las células obtenidas mediante el método de la presente invención

tienen una expresión más baja de un grupo de genes relacionados con cáncer o un nivel de expresión de los mismos más bajo que el obtenido en un método de cultivo que usa suero exógeno (por ejemplo, FBS). Los ejemplos de los genes relacionados con cáncer que no son preferibles pueden incluir EWI-FLI-1, FUS-CHOP, EWS-ATF1, SYT-SSX1, PDGFA, FLI-1, FEV, ATF-1, WT1, NR4A3, CHOP/DDIT3, FUS/TLS, BBF2H7, CHOP, MDM2, CDK4, HGFR, c-met, PDGFα, HGF, GFRA1, FASN, HMGCR, RGS2, PPARγ, YAP, BIRC2, lumican, caldesmón, ALCAM, Jam-2, Jam-3, cadherina II, DKK1, Wnt, nucleostemina, neurofibromina, RB, CDK4, p16, MYCN, telómero, hTERT, ALT, Ras, TK-R, CD90, CD105, CD133, VEGFR2, CD99, ets, ERG, ETV1, FEV, ETV4, MYC, EAT-2, MMP-3, FRINGE, ID2, CCND1, TGFBR2, CDKNIA, p57, p19, p16, p53, IGF-1, c-myc, p21, ciclina D1, y p21.

En la presente memoria descriptiva, el término “nivel de expresión disminuido (o aumentado)” quiere decir que la “razón de registro de señal” basándose en un algoritmo bien conocido en la técnica (algoritmo GeneChip (AFFYMETRIX, Inc.) es “-1≤” o “1≤” (es decir, la razón del nivel de expresión del gen entre el nivel inicial y el conjunto de experimentos es de dos veces o más (tabla 5)), más preferentemente, “-2≤” o “2≤” (es decir, la razón del nivel de expresión del gen entre el nivel inicial y el conjunto de experimentos es de cuatro veces o más). El término “gen descrito en la tabla” usado en el presente documento quiere decir un gen identificado mediante “ID del conjunto de sonda” descrito en esta tabla (este gen incluye variantes que conservan las funciones del gen). Estos genes se corresponden con los genes representados por el símbolo del gen. El símbolo del gen es un nombre asociado únicamente con cada gen por NCBI, US. Los detalles de la ID del conjunto de sonda y el símbolo del gen se describen en la base de datos NetAffx de AFFYMETRIX, Inc. y los expertos en la técnica los entienden fácilmente. El término “variantes” usado para genes se usa de manera intercambiable con el término “variantes de gen” y quiere decir cualquiera de (i) los que comprenden una secuencia de nucleótidos derivada de la secuencia de nucleótidos del gen identificado mediante la deleción, sustitución o adición de una o más bases, (ii) los que comprenden una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse en condiciones rigurosas con el gen identificado, y (iii) los que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene al menos una identidad del 80 % con la secuencia de nucleótidos del gen identificado. Todas estas variantes conservan las funciones del gen identificado. El término “funciones del gen” usado en el presente documento se usa de manera intercambiable con el término “funciones de una proteína codificada por el gen”. Una proteína codificada por el “gen descrito en la tabla” es una proteína que tiene funciones bien conocidas, y también son bien conocidos en la técnica sistemas de ensayo para confirmar las funciones. Por consiguiente, los expertos en la técnica pueden usar técnicas bien conocidas en la técnica para preparar fácilmente tales variantes de gen y para confirmar fácilmente sus funciones. Por ejemplo, los procedimientos específicos de hibridación y las condiciones de hibridación “rigurosas” pueden realizarse según métodos bien conocidos en la técnica, tales como los métodos descritos en “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, J. Sambrook y D. W. Russell, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, NY (2001)” (incorporado en el presente documento como referencia).

En la presente invención, se pretende que el grupo de antígenos CD se confirme como “expresados” o “no expresados” basándose en los resultados obtenidos usando el modo análisis en el programa de funcionamiento GeneChip (GCOS) de Affymetrix, Inc. Además, las proteínas codificadas por las variantes del gen que conservan las funciones del gen descrito en la tabla pueden ser variantes de la proteína codificada por el gen descrito en la tabla. El término “variantes” usado para proteínas se usa de manera intercambiable con el término “variantes de proteína” y quiere decir los que comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el gen identificado, mediante la deleción, sustitución o adición de uno o más aminoácidos. Los expertos en la técnica pueden usar también técnicas bien conocidas en la técnica para preparar fácilmente tales variantes de proteína y para confirmar fácilmente sus funciones.

Las células según la presente invención son células que tienen la capacidad de crecer disponibles para su uso en la reparación y regeneración de tejido. Los ejemplos de células de donante usadas en la reparación y regeneración de tejido incluyen células madre tisulares autólogas o alogénicas o células madre somáticas o células madre embrionarias. Por consiguiente, las células según la presente invención pueden ser células derivadas de células madre tisulares, células madre somáticas o células madre embrionarias. Las células según la presente invención son preferentemente células autólogas, particularmente, células derivadas de células madre somáticas (por ejemplo, células de médula ósea) que pueden asegurar las células de donante de manera no invasiva, teniendo en cuenta problemas éticos, riesgos de infección, necesidad de usar agentes inmunosupresores, etc.

Las células madre tisulares, células madre somáticas o células madre embrionarias pueden suministrarse del tejido o el fluido corporal de un individuo mamífero. Los ejemplos del tejido preferible como fuente de estas células incluyen tejidos musculares, tejidos óseos, tejidos adiposos, piel, tejidos linfáticos, conductos vasculares, órganos digestivos, raíces del pelo, pulpa dental y embriones (excepto embriones humanos). Los ejemplos de los fluidos corporales preferibles como fuente incluyen un fluido de médula ósea, sangre (sangre periférica o sangre del cordón umbilical), y linfa. En particular, cuando el sujeto que va a repararse y regenerarse es tejido del sistema nervioso, los ejemplos de la fuente de las células de donante incluyen médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, embriones fetales y cerebro. Cuando el sujeto que va a repararse y regenerarse es un tejido hematopoyético, los ejemplos de la fuente incluyen médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical y embriones fetales. Los expertos en la técnica pueden usar técnicas bien conocidas en la técnica para preparar fácilmente las células deseadas.

Las células según la presente invención son células disponibles para su uso en la reparación y regeneración de tejido y son por tanto, preferentemente, células adherentes, más preferentemente células derivadas de, por ejemplo: células madre somáticas tales como células mesenquimatosas, células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, células madre de la sangre del cordón umbilical, células madre corneales, células madre hepáticas y células madre pancreáticas; monocitos de células madre embrionarias (excepto embriones humanos) tales como células madre fetales; y osteoblastos, fibroblastos, células de ligamento, células epiteliales y células endoteliales vasculares. Con el propósito de usar las células en el tratamiento de una enfermedad neurológica en la fase aguda, se prefiere que las células según la presente invención se deriven de células madre, particularmente, de células madre mesenquimatosas. Las células madre mesenquimatosas son células madre que están presentes en una cantidad traza en las células intersticiales en tejidos mesenquimatosos y tiene pluripotencia y la capacidad de autorreplicarse. Se ha encontrado en los últimos años que las células no solo se diferencian en células del tejido conjuntivo tales como osteocitos, condrocitos y adipocitos sino que también tienen potencia de diferenciación en células neuronales o células miocárdicas. En este contexto, las células madre en un estado indiferenciado tienen una tasa de crecimiento mayor y una tasa de supervivencia mayor tras su introducción en sujetos vivos. Por tanto, se prefiere que las células según la presente invención sean células en un estado indiferenciado derivadas de células madre.

Las células según la presente invención son preferentemente células derivadas de humano y pueden ser células derivadas de mamíferos distintos de humanos (por ejemplo: roedores tales como ratones, ratas, cobayas y hámsteres; primates tales como chimpancés; animales del orden *Artiodactyla* tales como vaca, cabras y ovejas; animales del orden *Perissodactyla* tales como caballos; y conejos, perros, y gatos).

El autosuero usado en el presente documento es suero de un individuo del que se derivan las células (autosuero). Sin embargo, puede obtenerse también una tasa de crecimiento elevada usando suero de otros humanos adultos cuando el uso del autosuero es difícil.

Tal como se describió anteriormente, las células según la presente invención tienen una tasa de crecimiento mayor en presencia de suero alogénico, particularmente, autosuero, que en presencia de suero exógeno. Además, las células según la presente invención son células seguras que se mantienen en un estado más indiferenciado con alta potencia de diferenciación. El medio usado en el cultivo celular según la presente invención se selecciona adecuadamente de entre diversos medios convencionales conocidos en la técnica (por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), NPBM y αMEM) según el tipo de las células, el nivel de diferenciación y la dirección deseada, una tasa de crecimiento necesaria, etc. Preferentemente se usa DMEM.

En un aspecto, las células cultivadas mediante el método de la presente invención pueden usarse en la producción de una preparación farmacéutica para reparación/regeneración de tejido.

Un fármaco terapéutico que comprende las células obtenidas mediante el método de crecimiento de la presente invención como principio activo, cuando se administra a un sujeto, puede reparar y regenerar un tejido como un sujeto que ha perdido su función. En particular, cuando se usan células madre mesenquimatosas, puede repararse y regenerarse un tejido cerebral en encefalopatía isquémica (véase el documento WO02/00849A1). La reparación y regeneración de tejido usadas en el presente documento son sinónimos de reparación y regeneración de las funciones. Los efectos terapéuticos de, por ejemplo, la reparación/regeneración de un tejido del sistema nervioso abarca efectos neuroprotectores (por ejemplo, nueva mielinización de axones), efectos neurotróficos (por ejemplo, reposición de neurogliocitos), angiogénesis cerebral, regeneración nerviosa, etc. Específicamente, los efectos terapéuticos de la preparación farmacéutica que comprende las células crecidas mediante el método de la presente invención significan la reparación/regeneración de tejido como entidad y la reparación/regeneración de la disfunción del tejido como fenómeno. Cuando se usan las células crecidas para reparación/regeneración de tejido, se prefiere que la fuente de células de donante se confirme de antemano mediante examen de la sangre periférica para no infectarse con HIV, ATL, HB, HC, sífilis, parvovirus humano B19, y similares.

Además, en un aspecto, las células crecidas mediante el método de la presente invención pueden usarse en el diagnóstico de una enfermedad o infección con patógenos. Por ejemplo, puede diagnosticarse el riesgo de cáncer examinando el estado de los genes relacionados con cáncer contenidos en las células que se recogen de un sujeto y se hacen crecer *ex vivo.*

Además, es difícil detectar una enfermedad priónica en un sujeto mediante los métodos de examen habituales. Sin embargo, puede diagnosticarse tal enfermedad priónica haciendo crecer células mediante el método de la presente invención y de este modo amplificar rápidamente los priones anómalos hasta un nivel igual a o mayor que la sensibilidad de detección.

De forma alternativa, las células crecidas mediante el método de la presente invención pueden usarse en experimentos *in vivo* o i*n vitro*.

Los ejemplos de la preparación farmacéutica para la reparación/regeneración de tejido que comprende las células crecidas mediante el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, inyecciones (por ejemplo,

inyecciones que contienen células progenitoras neurales, células madre hematopoyéticas, células hepáticas, células pancreáticas o linfocitos) e implantes para trasplante (por ejemplo, capas de células miocárdicas, piel artificial, cornea artificial, raíces dentales artificiales y articulaciones artificiales) que comprenden las células crecidas *ex vivo* usando el método de la presente invención en combinación con diluyentes, excipientes y/o bases farmacéuticamente aceptables.

La preparación farmacéutica que comprende las células cultivadas mediante el método de la presente invención puede usarse para la reparación/regeneración de un tejido del sistema nervioso. Por ejemplo, pueden hacerse crecer células madre mesenquimatosas autólogas y usarse en una preparación farmacéutica para el tratamiento de enfermedad neurológica isquémica. En un aspecto preferible, las células contenidas en la preparación farmacéutica son células derivadas de un sujeto al que se le administran las células (células autólogas).

Los ejemplos de enfermedad del sistema nervioso seleccionada como diana por tal terapia celular incluyen, pero no se limitan a, enfermedades desmielinizantes centrales y periféricas, enfermedades degenerativas centrales y periféricas, apoplejía cerebral (incluyendo infarto cerebral, hemorragia cerebral y hemorragia subaracnoidea), tumor cerebral, disfunción superior que incluye demencia, enfermedades psiquiátricas, epilepsia, enfermedad traumática del sistema nervioso (incluyendo traumatismo craneoencefálico, contusión cerebral y lesión de médula espinal), fractura de la médula espinal, y enfermedades priónicas (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de kuru, encefalopatía espongiforme bovina, y encefalopatía espongiforme ovina).

Las células crecidas mediante el método de la presente invención son útiles también para el tratamiento de enfermedades distintas de enfermedades del sistema nervioso. Para el tratamiento de, por ejemplo, la leucemia aguda, pueden hacerse crecer células madre hematopoyéticas *ex vivo* y trasplantarse en médula ósea. El trasplante habitual de médula ósea requiere normalmente $2x10^8$ células para autotrasplante y $4x10^8$ células para alotrasplante, por peso corporal de un receptor, y por tanto la cantidad de un fluido de médula ósea recogido de un donante de células puede alcanzar los 1000 ml. Sin embargo, la carga física del donante de células puede reducirse haciendo crecer rápidamente las células *ex vivo* usando el método de la presente invención. Además, para el tratamiento de una infección viral o similar, pueden hacerse crecer *ex vivo* linfocitos T recogidos de la sangre periférica de un paciente usando el método de la presente invención y trasplantarse a este paciente.

La fuente de células de donante usadas en la reposición de células para reparación/regeneración de tejido puede derivarse de células madre tisulares autólogas o alogénicas o células madre somáticas, o células madre embrionarias. Es preferible una terapia de autotrasplante que usa células autólogas, particularmente, células derivadas de células madre somáticas (por ejemplo, células de médula ósea) que pueden asegurar las células de donante de manera no invasiva teniendo en cuenta problemas éticos, riesgo de infección y dificultad tal como la necesidad de usar agentes inmunosupresores. Pueden usarse las células derivadas de otros humanos u otros animales cuando la terapia de autotrasplante es difícil. Las células de donante pueden ser células contenidas en una muestra recogida inmediatamente antes del cultivo o pueden ser células conservadas criogénicamente siempre que la cantidad del anticoagulante contenido en la muestra al inicio del cultivo sea de menos de 5 U/ml. De forma alternativa, pueden hacerse crecer células autólogas de antemano, después conservarse criogénicamente y administrarse en el momento del tratamiento de la enfermedad, tal como se muestra en, por ejemplo, un modelo terapéutico que usa un sistema de soporte de administración celular terapéutico descrito en el documento WO 2005/001732A1.

La fuente de las células es de manera deseable aquella que contiene células que ya se sabe que se diferencian en una especie celular de un tejido particular que va a repararse/regenerarse, por ejemplo, células de la misma capa germinativa o células madre totipotenciales. Sin embargo, se ha encontrado también que las células madre diferenciadas en cierto grado en una capa germinativa diferente (por ejemplo, células el hígado fetal) vuelven a diferenciarse en otras células tisulares tales como células del sistema nervioso (por ejemplo, células descritas en el documento WO 02/00849A1). Teniendo en cuenta este hallazgo, pueden usarse tejidos que contienen células de una capa germinativa diferente siempre que pueda inducirse que las células se diferencien en la especie de célula deseada usando un factor inductor de diferenciación o similar conocido en la técnica.

Cuando el tejido que va a repararse es un tejido del sistema nervioso, los ejemplos de la fuente de las células de donante incluyen células derivadas de médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, embriones fetales y cerebro. Cuando el tejido que va a repararse es un tejido hematopoyético, los ejemplos de la fuente incluyen células madre hematopoyéticas y células madre de la sangre del cordón umbilical contenidas en médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical o embriones fetales.

El uso de células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea para la reparación de un tejido del sistema nervioso tiene, por ejemplo, las siguientes ventajas: 1) puede esperarse que las células produzcan efectos significativos, 2) conllevan riesgo bajo de efectos secundarios, 3) puede esperarse que se suministren suficientes células de donante, 4) consiguen tratamiento no invasivo y autotrasplante; por tanto 5) tal terapia celular conlleva riesgo de infección bajo, 6) no está en peligro de rechazo inmunológico, 7) no produce problemas éticos, 8) se acepta fácilmente por la sociedad y 9) se establece amplia y fácilmente como atención médica general. Además, la terapia de trasplante de médula ósea es un tratamiento que ya se usa en la práctica clínica y que se ha confirmado

que es seguro. Además, las células madre derivadas de médula ósea, que tienen elevadas propiedades de migración, pueden llegar al tejido dañado deseado no solo mediante trasplante local sino también mediante administración intravenosa para ejercer luego sus efectos terapéuticos en el mismo.

El fluido de médula ósea puede recogerse, por ejemplo, anestesiando de manera local o sistémica animales que sirven como fuente de recogida (incluyendo humanos) e insertando una aguja en el esternón o en el ilion, seguido por succión usando una jeringa. Además, una técnica establecida para la sangre del cordón umbilical comprende insertar directamente una aguja en el cordón umbilical de un bebé recién nacido, recoger a continuación la sangre del cordón umbilical por succión usando una jeringa, y almacenar la sangre del cordón umbilical recogida. En métodos convencionales, se usa un anticoagulante para evitar que componentes sanguíneos coagulen en el fluido de médula ósea recogido. En cambio, en el método de la presente invención, no tiene que usarse un anticoagulante de este tipo, tal como se describió anteriormente.

Un posible método para administrar, a un tejido dañado, la preparación farmacéutica que comprende las células crecidas mediante el método de la presente invención es, por ejemplo, trasplante local por medios quirúrgicos, administración intravenosa, administración mediante punción lumbar, administración mediante inyección local, administración hipodérmica, administración intradérmica, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intracerebral, administración intracerebroventricular o administración venosa. Además, las células crecidas mediante el método de la presente invención pueden contenerse o sembrarse en implantes, bases de capa celular, articulaciones artificiales o similares y trasplantarse a un sujeto vivo.

Por ejemplo, cuando se usan las células para la reparación del sistema nervioso, el trasplante celular a un paciente mediante inyección puede realizarse: llenando una jeringa con las células que van a trasplantarse, en un estado flotante usando un líquido cefalorraquídeo artificial, solución salina, o similar; exponiendo un tejido nervioso dañado por cirugía; e inyectando directamente el contenido de la jeringa a este sitio de lesión. Las células que tienen propiedades de migración suficientemente altas para poderse mover en un tejido (por ejemplo, células describas en el documento WO 02/00849A1) pueden trasplantarse en las proximidades de un sitio de lesión. Además, puede esperarse que tales células ejerzan sus efectos incluso mediante inyección en líquido cefalorraquídeo. En este caso, las células pueden inyectarse mediante punción lumbar habitual y son por tanto preferibles porque el paciente no tiene que operarse y can puede tratarse solo con anestesia local en una sala de hospital. Además, también puede esperarse que las células ejerzan sus efectos mediante inyección intravenosa. Por tanto, las células son preferibles desde el punto de vista de permitir el trasplante por la manera habitual de transfusión y conseguir procedimientos de trasplante en una sala.

El medio adecuado para el crecimiento celular según la presente invención se selecciona según el tipo de las células, el nivel diferenciación y la dirección deseada, una tasa de crecimiento necesaria,, etc. Los ejemplos de un medio adecuado para hacer crecer células madre mesenquimatosas usado para la reparación del sistema nervioso incluyen, pero no se limitan a, medio basal progenitor neural (NPBM: fabricado por Clontech) y medio αMEM, además del medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) mostrado a continuación. Un medio convencional de este tipo se complementa con suero tal como se describió anteriormente y se complementa adicionalmente, si es necesario, con un factor nutricional (por ejemplo, aminoácidos), un antibiótico, un factor de crecimiento y/o una sustancia promotora del crecimiento y similares.

Los ejemplos específicos del medio convencional incluyen medio modificado por Dulbecco que contiene los siguientes componentes a las siguientes concentraciones (mg/l):

$CaCl_2$ (anhidro): de 160 a 240

KCl: de 320 a 480

$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$: de 0,08 a 1,2

$MgSO_4$ (anhidro): de 80 a 120

NaCl: de 5120 a 7680

$NaHCO_3$: de 2960 a 4440

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$: de 100 a 150

D-glucosa: de 3600 a 5400

Rojo de fenol: de 12 a 18

Piruvato de sodio: de 88 a 132

L-arginina·HCl: de 67 a 101

L-cisteína·2HCl: de 50 a 76

L-histidina·HCl·H_2O: de 34 a 50

L-isoleucina: de 84 a 126

L-leucina: de 84 a 126

L-lisina·HCl: de 117 a 175

L-metionina: de 24 a 36

L-fenilalanina: de 53 a 79

L-serina: de 34 a 50

L-treonina: de 76 a 114

L-triptófano: de 13 a 19

L-tirosina (sal disódica): de 83 a 125

L-valina: de 75 a 113

Cloruro de colina: de 3,2 a 4,8

Ácido D-Ca-pantoténico: de 3,2 a 4,8

Ácido fólico: de 3,2 a 4,8

i-inositol: de 5,8 a 8,6

Niacinamida: de 3,2 a 4,8

Piridoxal·HCl: de 3,2 a 4,8

Riboflavina: de 0,3 a 0,5

Tiamina·HCl: de 3,2 a 4,8

Si se desea, pueden usarse antibióticos usados habitualmente en el campo del cultivo celular (por ejemplo, penicilina y estreptomicina) solos o en combinación. Es preferible el uso combinado de una pluralidad de antibióticos. Por ejemplo, cuando se usan penicilina y estreptomicina en combinación, sus cantidades son respectivamente del 0,5 al 2 % en volumen, preferentemente del 0,8 al 1,2 % en volumen, con respecto al volumen del medio.

Los ejemplos de aminoácidos de escasa masa molecular contenidos en el medio incluyen L-alanina, L-aspartato, L-cisteína, L-glutamina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina, L-valina, ácido L-ascórbico y ácido L-glutámico. Estos aminoácidos están contenidos como nutrientes en un medio usado habitualmente en el campo del cultivo celular.

Además, los presentes inventores han encontrado que la adición de glutamina en una cantidad del 0,1 al 2 % (peso/volumen) de la cantidad completa del medio es esencial para un rápido crecimiento de las células madre mesenquimatosas y han encontrado además que la reposición de glutamina para mantener la cantidad del 0,1 al 2 % (peso/volumen) en el medio promueve además un rápido crecimiento.

El medio convencional puede complementarse, si es necesario, con un factor de crecimiento, una sustancia promotora del crecimiento y/o un factor inductor de diferenciación. El factor de crecimiento, la sustancia promotora del crecimiento y el factor inductor de diferenciación se seleccionan según el nivel de diferenciación y la dirección deseada, una tasa de crecimiento necesaria,, etc. Los ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a: vitaminas tales como ácido ascórbico y nicotinamida; factores neurotróficos tales como NGF y BDNF; factores osteogénicos tales como BMP; y citocinas tales como sustancias promotoras del crecimiento de células epiteliales, sustancia básica promotora del crecimiento de fibroblastos, sustancia promotora del crecimiento de tipo insulina e IL-2.

El método de cultivo celular de la presente invención se realiza específicamente, por ejemplo, tal como sigue:

1. Se añade una muestra recogida de un sujeto vivo usando una jeringa cuya pared interna se humedece con una disolución de heparina tal como se describió anteriormente a una razón de dilución del orden de 100 veces o menos, preferentemente 10 veces o menos, de manera más preferible aproximadamente de 2 veces a 6 veces, a un medio mantenido de antemano a 37±0,5 ºC. Luego se siembra la disolución en una placa de cultivo y se incuba a 37±0,5 ºC en el 5 % de CO_2. Se reemplaza el medio al menos una vez a la semana, normalmente de una a dos veces a la semana. Se prepara el medio añadiendo suero y los adyuvantes necesarios para un medio convencional adecuado, después se esteriliza usando un esterilizador por filtración y se divide en pequeñas porciones, que se almacenan a continuación en una caja fría a 4 ºC. Se mantiene el medio a 37±0,5 ºC de antemano y después se usa. A una temperatura que supera 37,5 ºC, muere el número aumentado de células. En cambio, a una temperatura más baja de 36,5 ºC, las células crecen rápidamente. La concentración de CO_2 está preferentemente en el intervalo del 5±1 %. En todas las etapas, se mantiene una disolución en contacto con las células en este intervalo de temperatura. Como resultado, se promueve un rápido crecimiento.

2. Se confirma que las células se adhieren a la base de la placa de cultivo. Luego, se separan el medio y los componentes de células de la sangre que flotan en el medio y se extraen por succión. Posteriormente, la superficie de las células madre adherentes se lava con solución salina tamponada con fosfato como lavado.

3. Se subcultivan las células en el momento en que la densidad de las células en la placa alcanza las 5.500 células/cm^2 o más, como directriz, es decir, en el momento en que las células alcanzan del 60 al 80 %, preferentemente del 65 al 75 % de confluencia para que no superen la densidad celular de 8.500 células/cm^2. Para el subcultivo, se añade un agente de disociación compuesto principalmente por tripsina y opcionalmente por EDTA (etilendiaminotetraacetato) en una cantidad de 3 ml/placa. Tras la incubación a 37±5 ºC durante de 3 a 5 minutos, se confirma que las células madre adherentes se disocian de la placa. El medio se reemplaza con una disolución de separación por decantación, y se transfieren las células en el medio a un tubo de centrífuga predeterminado y sedimentan por centrifugación, seguido de subcultivo. Se repite el ciclo que implica cultivo, reemplazo del medio y subcultivo al menos hasta que el número total de las células madre mesenquimatosas alcance las 100.000.000 células o más. El reemplazo del medio se realiza al menos una vez a la semana.

Se repite este ciclo para obtener rápidamente el número de células previsto (por ejemplo, para células madre mesenquimatosas, pueden obtenerse $1x10^8$ células en el plazo de 2 semanas).

Si se desea, puede usarse un material de soporte celular para facilitar la disociación de las células tras el crecimiento. Los ejemplos preferibles del material de soporte incluyen, pero no se limitan a, cerámicas inorgánicas porosas, micropilares (por ejemplo, la placa de cultivo celular Nanopillar fabricada por Hitachi, Ltd.), tela no tejida y películas de membrana en panal de abeja.

En un aspecto de la presente invención, las células que van a cultivarse pueden transfectarse de antemano con, por ejemplo, genes que inducen crecimiento y diferenciación, tales como genes de BDNF, PLGF, GDNF o IL-2. De forma alternativa, las células que van a cultivarse pueden ser células inmortalizadas transfectadas con genes de inmortalización tales como genes de telomerasa. La transfección de tales genes se divulga en, por ejemplo, el documento WO03/038075A1.

Los expertos en la técnica pueden seleccionar, sin problemas, una combinación que produce la tasa de crecimiento deseada y/o induce diferenciación en una especie celular particular, de entre los medios, los materiales de soporte, los adyuvantes, los factores de crecimiento y/o la transfección génica facilitados a modo de ejemplo anteriormente.

Las células crecidas mediante el método de la presente invención pueden administrarse directamente para reparación/regeneración de tejido. Para mejorar la eficacia terapéutica, pueden administrarse o trasplantarse las células como una composición complementada de manera arbitraria con diversos agentes o tras la transfección génica. Los ejemplos de posibles enfoques para este fin incluyen, pero no se limitan a: adición de sustancias que mejoran adicionalmente la tasa de crecimiento, en un tejido, de las células crecidas mediante el método de la presente invención, sustancias que promueven su diferenciación en las células deseadas, o sustancias que mejoran su tasa de supervivencia en un tejido y/o transfección con genes que tienen tales efectos; adición de sustancias que tienen el efecto de bloquear la mala influencia de un tejido biológico en las células trasplantadas y/o transfección con genes que tienen tales efectos; adición de sustancias que prolongan la vida de las células de donante y/o transfección con genes que tienen tales efectos; adición de sustancias que ajustan el ciclo de la célula y/o transfección con genes que tienen tales efectos; adición de sustancias destinadas a inhibir los inmunocitos y/o transfección con genes que tienen tales efectos; adición de sustancias que activan el metabolismo energético y/o transfección con genes que tienen tales efectos; adición de sustancias que mejoran la actividad quimiotáctica de las células de donante en un tejido y/o transfección con genes que tienen tales efectos; y adición de sustancias que mejoran el flujo sanguíneo y/o transfección con genes que tienen tales efectos.

El cultivo celular se realiza, preferentemente, en un centro de procesamiento celular (CPC) según las BPF. Se

prefiere que se prepare un “grado clínico de células” que va a administrarse a un sujeto en una instalación especial diseñada para la manipulación celular en un estado estéril, más específicamente, un CPC que tiene la limpieza garantizada usando aire acondicionado, control de presión de la cámara, control de temperatura y humedad, contadores de partículas, filtros HEPA, etc. Además, se prefiere que se garantice el rendimiento mediante validación no solo para la propia instalación CPC, sino también para todos los instrumentos usados en el CPC y sus funciones siempre deben monitorizarse y grabarse. Es deseable que todos los procedimientos de procesamiento de células en el CPC se controlen y registren estrictamente según el “manual convencional”.

La preparación farmacéutica de la presente invención puede contener, como componente celular, una especie celular distinta de células madre mesenquimatosas. Sin embargo, es preferible que las células madre mesenquimatosas ocupen una elevada proporción con respecto a los componentes celulares. Por tanto, en un aspecto preferible de la preparación farmacéutica de la presente invención, la proporción del número de las células madre mesenquimatosas con respecto al número total de células contenidas en la preparación farmacéutica es el 50 % o más, preferentemente el 75 % o más, más preferentemente el 80 % o más, incluso más preferentemente el 90 % o más, preferentemente de manera adicional el 95 % o más, preferentemente de manera particular el 98 % o más. Lo más preferentemente, el medio está sustancialmente libre de una especie celular distinta de células madre mesenquimatosas, por ejemplo, células madre hematopoyéticas. Puede determinarse fácilmente la proporción de las células madre mesenquimatosas en los componentes celulares, por ejemplo, etiquetando las células contenidas en la preparación farmacéutica con anticuerpos de etiquetado frente a uno o más marcadores (por ejemplo, antígenos de superficie tales como CD105, CD73, CD166, CD9 y CD157) específicos para células madre mesenquimatosas y analizando las células etiquetadas mediante citometría de flujo o similar.

Es más preferible un mayor número de células madre mesenquimatosas contenidas en la preparación farmacéutica de la presente invención. Sin embargo, el número de las células es prácticamente la cantidad eficaz mínima teniendo en cuenta el momento de la administración a un sujeto y el tiempo requerido para el cultivo. Por tanto, en un aspecto preferible de la preparación farmacéutica de la presente invención, el número de las células madre mesenquimatosas es 10^7 células o más, preferentemente $5x10^7$ células o más, más preferentemente 10^8 células o más, incluso más preferentemente $5x10^8$ células o más.

Las especies celulares distintas de células madre mesenquimatosas, cuando se desea que ayuden en la reparación de un tejido nervioso, son células que se obtienen por separación de, por ejemplo, médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, o hígado fetal y son capaces de diferenciarse en células del sistema nervioso. Los ejemplos de las mismas pueden incluir, pero no se limitan a, células intersticiales caracterizadas por Lin-, Sca-1+, CD10+, CD11D+, CD44+, CD45+, CD71+, CD90+, CD105+, CDW123+, CD127+, CD164+, fibronectina+, ALPH+ y colagenasa-1+, y células caracterizadas por AC133+. De forma alternativa, pueden usarse otras especies celulares arbitrarias capaces de diferenciarse en células del sistema nervioso.

Las células intersticiales pueden obtenerse, por ejemplo, seleccionando células que tienen un marcador de superficie celular tal como CD45, de una fracción celular obtenida por centrifugación de células de médula ósea o células de la sangre del cordón umbilical. De forma alternativa, estas células pueden prepararse también sometiendo las células de médula ósea o las células de la sangre del cordón umbilical recogidas de vertebrados a centrifugación en gradiente de densidad a 800 g en una disolución durante un tiempo suficiente para la separación según la gravedad y, tras la centrifugación, recoger una fracción celular que tiene una gravedad dada que cae en el intervalo de gravedad de 1,07 a 1,1 g/ml. En este contexto, el término “tiempo suficiente para separación según la gravedad” significa un tiempo suficiente para que las células ocupen la posición, según su gravedad, en la disolución para centrifugación en gradiente de densidad y habitualmente es de aproximadamente 10 a 30 minutos. La gravedad de la fracción celular que va a recogerse está, preferentemente, en el intervalo de 1,07 a 1,08 g/ml, por ejemplo, 1,077 g/ml. Los ejemplos de la disolución para centrifugación en gradiente de densidad que pueden usarse pueden incluir, pero no se limitan a, soluciones Ficoll y Percoll.

Específicamente, un fluido de médula ósea o sangre del cordón umbilical recogido de vertebrados se mezcla en primer lugar con la misma cantidad de una disolución (PBS+ BSA al 2 % + citrato de sodio al 0,6 % + penicilina-estreptomicina al 1 %). Una alícuota de 5 ml de la misma se mezcla con una solución Ficoll+Paque (1,077 g/ml) y se centrifuga (800 g durante 20 minutos) para extraer una fracción de monocitos. Esta fracción de monocitos se mezcla con una disolución de cultivo para lavado celular (αMEM, FBS al el 12,5 %, suero de caballo el 12,5 %, i-inositol al 0,2 %, ácido fólico 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM, L-glutamina 2 mM, hidrocortisona 1 μM, y disolución antibiótica-antimicótica al 1 %) y se centrifuga (2000 rpm durante 15 minutos). Posteriormente, se retira el sobrenadante tras la centrifugación y, a continuación, se recogen las células precipitadas y se cultivan (a 37 ºC, el 5 % de CO_2).

Pueden obtenerse las células AC133+, por ejemplo, seleccionando células que tienen un marcador de superficie celular AC133, de una fracción celular obtenida por centrifugación de células de médula ósea, células de la sangre del cordón umbilical o células de la sangre periférica. Además, en un aspecto alternativo, estas células pueden prepararse también: sometiendo las células de hígado fetal recogidas de vertebrados a centrifugación en gradiente de densidad a 2000 rpm en una disolución durante un tiempo suficiente para separación según la gravedad; tras la centrifugación, recogiendo una fracción celular que tiene una gravedad dada que cae en el intervalo de gravedad de

1,07 a 1,1 g/ml; y recogiendo las células caracterizadas por AC133+, de esta fracción celular. En este contexto, el término “tiempo suficiente para separación según la gravedad” significa un tiempo suficiente para que las células ocupen la posición, según su gravedad, en la disolución para centrifugación en gradiente de densidad y habitualmente es de aproximadamente 10 a 30 minutos. Los ejemplos de la disolución para centrifugación en gradiente de densidad que pueden usarse pueden incluir, pero no se limitan a, soluciones Ficoll y Percoll.

Específicamente, se lava en primer lugar un tejido hepático recogido de vertebrados en una disolución L-15, después se trata enzimáticamente (a 37 ºC durante 30 minutos en una disolución que contiene L-15+ADNasa I al 0,01 %, tripsina al 0,25 % y colagenasa al 0,1 %), y se pipetea para preparar células individuales. Se centrifugan estas células individuales como células hepáticas fetales. Por tanto, las células obtenidas se lavan, y se recogen células AC133+ de las células lavadas, usando anticuerpos AC133. Como resultado, pueden prepararse células capaces de diferenciarse en células del sistema nervioso de células hepáticas fetales. La recogida de las células AC133+ usando los anticuerpos puede realizarse usando perlas magnéticas o un sistema de clasificación celular (por ejemplo, FACS).

La preparación farmacéutica de la presente invención es preferentemente una preparación administrada por vía parenteral, más preferentemente una preparación administrada sistémicamente por vía parenteral, particularmente, una preparación administrada por vía intravenosa. Los ejemplos de formas de dosificación adecuadas para la administración parenteral incluyen, pero no se limitan a: inyecciones tales como inyecciones solubles, inyecciones que pueden suspenderse, inyecciones que pueden emulsionarse e inyecciones que van a prepararse antes de su uso; e injertos. La preparación para administración parenteral puede estar en forma de disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles. Específicamente, la preparación puede prepararse en una forma de dosificación unitaria apropiada combinando apropiadamente, por ejemplo, portadores o vehículos farmacológicamente aceptables, específicamente, agua esterilizada o solución salina, medios, solución salina tamponada tal como PBS, aceites vegetales, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, tensioactivos, estabilizantes, excipientes, vehículos, conservantes, aglutinantes y similares.

Los ejemplos de disoluciones acuosas inyectables incluyen, pero no se limitan a, solución salina, medios, solución salina tamponada tal como PBS, agentes de tonicidad que contienen glucosa u otros adyuvantes, por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico. Estas disoluciones pueden usarse en combinación con un agente de solubilización apropiado, por ejemplo, alcohol, específicamente, etanol o polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol) y/o con un tensioactivo no iónico, por ejemplo, polisorbato 80 o HCO-50.

En la presente invención, la lesión significa que un sujeto vivo padece de algún daño local o sistémico producido por factores endógenos y/o exógenos. Por tanto, la lesión según la presente invención abarca diversos estados tales como diversos traumatismos, infartos, lesiones degenerativas y destrucciones de tejido. Además, el sitio de lesión también abarca diversos tejidos en todo el cuerpo, por ejemplo, cerebro, nervios, riñón y páncreas, hígado, corazón, piel, hueso y cartílago. El sitio de lesión puede aparecer en una posición o puede aparecer en una pluralidad de posiciones. La preparación farmacéutica de la presente invención tiene efectos sobre diversos tejidos y puede reparar simultáneamente una pluralidad de sitios de lesión mediante una administración. Por tanto, la preparación farmacéutica de la presente memoria descriptiva es particularmente eficaz para el tratamiento de un sujeto que tiene una pluralidad de sitios de lesión. Los ejemplos de factores que producen la lesión incluyen, pero no se limitan a: fuerzas físicas externas tales como accidentes, quemaduras y bombardeos; diversas enfermedades isquémicas tales como enfermedad neurológica isquémica (infarto cerebral, infarto de médula espinal, etc.) y enfermedad cardiaca isquémica (por ejemplo, infarto de miocardio); diversas inflamaciones, diabetes mellitus, diversas infecciones, enfermedades autoinmunitarias, tumores, exposición a venenos, enfermedades desmielinizantes centrales y periféricas, enfermedades degenerativas centrales y periféricas, hemorragia cerebral, hemorragia subaracnoidea, tumor cerebral, disfunción superior incluyendo demencia, enfermedades psiquiátricas, epilepsia y enfermedades priónicas (por ejemplo, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, enfermedad de kuru, encefalopatía espongiforme bovina, y encefalopatía espongiforme ovina). La lesión según la presente invención se refiere normalmente a las que implican pérdida y/o reducción de las funciones del tejido.

Los ejemplos de la pérdida y/o reducción de las funciones del tejido pueden incluir, pero no se limitan a: para tejidos nerviosos, trastornos sensoriales (por ejemplo, dolor, entumecimiento e hipoestesia), trastornos motores (por ejemplo, parálisis, calambres musculares, hemiplejia, miembros temblorosos, dificultad para caminar, bradicinesia e incomodidad física), disfunción cerebral (por ejemplo, cefalea, trastorno de la memoria, conciencia alterada, trastorno del habla, convulsión, temblores, demencia, alucinación y comportamiento anómalo) y disautonomía (por ejemplo, sensación de mareo, vértigo, síncope, disuria y dishidrosis); para el riñón, pérdida y/o reducción de las funciones excretoras, funciones reguladoras para el equilibro de fluidos corporales tales como el equilibrio de electrolito/agua, y las funciones endocrinas; para el páncreas, pérdida y/o reducción de las funciones exocrinas y las funciones endocrinas; para el hígado, pérdida y/o reducción de las funciones metabólicas, funciones sintéticas y funciones exocrinas; y para el corazón, pérdida y/o reducción de funciones del flujo sanguíneo y funciones endocrinas. El experto en la técnica conoce la pérdida y/o reducción de funciones específicas producida por daño en un determinado tejido así como síntomas asociados con la misma.

Además, la reparación y regeneración del sitio de lesión son sinónimos de reparación y regeneración de las

funciones. Los efectos terapéuticos de, por ejemplo, la reparación/regeneración de un tejido del sistema nervioso abarca efectos neuroprotectores (por ejemplo, nueva mielinización de axones), efectos neurotróficos (por ejemplo, reposición de neurogliocitos), angiogénesis cerebral, regeneración nerviosa, etc. Específicamente, los efectos terapéuticos de la preparación farmacéutica de la presente invención significan la reparación/regeneración de tejido como entidad y la reparación/regeneración de la disfunción de un tejido como fenómeno. Los efectos terapéuticos en, por ejemplo, lesión cerebral, aparecen como reducción de edema, nueva mielinización de axones, aumento en el número de neurogliocitos, angiogénesis, regeneración nerviosa, etc. como entidad y aparece como recuperación en el torrente sanguíneo cerebral, recuperación de parálisis, alivio del dolor o entumecimiento, etc. como fenómeno. Estos efectos pueden confirmarse mediante examen físico, por ejemplo, examen de rayos X, TAC, examen IRM, examen ultrasónico, examen endoscópico o biopsia, en el tejido dañado. Además, pueden confirmarse también los efectos mediante diversos exámenes hematológicos, exámenes bioquímicos, exámenes de endocrinología, exámenes de la función motora, exámenes de la función cerebral, exámenes de la función cognitiva o similares.

La frase la preparación farmacéutica de la presente invención “ayuda en la reparación” del sitio de lesión normalmente significa, pero no se limitan a, que mediante la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención, los componentes en la presente preparación ayudan o apoyan en el mecanismo de reparación del sujeto vivo y promueven/potencian la reparación del sitio de lesión, en comparación con la ausencia de administración de la presente preparación. Esta frase también abarca la prevención de que la lesión en el sitio de lesión se expanda o se vuelva más grave, bloqueo de la lesión en progreso y recuperación de la misma. La administración de la presente preparación construye, en el sitio de lesión, un entorno adecuado para las funciones del mecanismo de reparación del sujeto vivo. Específicamente, la ayuda en la reparación provocada por la preparación farmacéutica de la presente invención puede lograrse mediante, por ejemplo, pero no se limita a, secreción de citocina, angiogénesis y/o regeneración de tejido (véase la figura 9).

Además, la preparación farmacéutica de la presente invención puede provocar, por ejemplo: para el riñón dañado que implique insuficiencia renal, mejora en el índice de la función renal tal como BUN y/o los valores de creatinina; para el páncreas dañado que implique reducción de las funciones de secreción de insulina del islote de Langerhans, mejora en la secreción de insulina o en el índice para diabetes mellitus tal como glucemia, concentración sérica de Glu A1 y/o concentración sérica de HbA1C; para el corazón dañado atribuido a enfermedad cardiaca isquémica, mejora en la concentración sérica de prostaglandina-D sintasa y/o la concentración sérica de homocisteína; y para hígado dañado que implique insuficiencia hepática, mejora en el índice para la función hepática tales como los valores de GOT, GPT y/o γ-GTP.

En un aspecto preferible de la preparación farmacéutica de la presente invención, la preparación farmacéutica se administra tras el tratamiento del sitio de lesión. En este contexto, el tratamiento del sitio de lesión normalmente significa el tratamiento de la lesión en la fase aguda o hiperaguda y abarca, por ejemplo, tratamiento para evitar que la lesión se expanda y tratamiento quirúrgico para la reparación de la lesión. Además, en otro aspecto preferible, la preparación farmacéutica de la presente invención se administra con el propósito de ayudar en el poder de reparación autónomo que posee el sujeto vivo.

Además, la preparación farmacéutica de la presente invención se administra preferentemente en la fase subaguda o posterior de la lesión. La fase subaguda se refiere a la convalecencia posterior a la fase de agravamiento (fase aguda o hiperaguda) de síntomas producida por la lesión y se refiere a un periodo de desde 1 hasta 2 meses tras el desarrollo de, por ejemplo, infarto cerebral.

Las células madre mesenquimatosas en la preparación farmacéutica de la presente invención son preferentemente células madre mesenquimatosas autólogas derivadas de células recogidas de un sujeto que tiene el sitio de lesión. El uso de las células autólogas puede evitar rechazo o riesgo de infección. Además, las células madre mesenquimatosas autólogas pueden recogerse antes del comienzo de la lesión o tras el comienzo de la lesión. Cuando las células se recogen antes de la comienzo de la lesión, las células recogidas deben almacenarse mediante un enfoque tal como conservación criogénica tras una ralentización arbitraria del crecimiento o el crecimiento. Esto es porque el comienzo de la lesión es habitualmente difícil de predecir. Cuando las células se recogen tras el comienzo de la lesión, las células recogidas pueden administrarse directamente a un sujeto tras una ralentización arbitraria del crecimiento o el crecimiento o pueden almacenarse después mediante un enfoque tal como conservación criogénica (por ejemplo, en un congelador a -152 ºC) y administrarse adecuadamente en un momento elegido. De forma alternativa, todas las células pueden administrarse simultáneamente, o algunas de ellas pueden almacenarse y administrarse adicionalmente, si es necesario.

En la presente invención, el término “sujeto” significa un organismo arbitrario individual y es preferentemente un animal, más preferentemente un mamífero, más preferentemente un individuo humano. En la presente invención, el sujeto tiene normalmente algún sitio de lesión.

La presente invención puede usarse en un método de evaluación para evaluar si las células cultivadas *ex vivo* son o no células disponibles para su uso en reparación y regeneración de tejido biológico. El método de evaluación según la presente memoria descriptiva comprende la etapa de medir un nivel de expresión de un gen particular en las células que van a evaluarse. El método de evaluación según la presente memoria descriptiva puede comprende la

etapa de medir un nivel de expresión de al menos uno de los genes descritos en las tablas 1 a 4 en las células que van a evaluarse. El método de evaluación según la presente realización puede comprender además la etapa de comparar el nivel de expresión de al menos uno de los genes descritos en las tablas 1 a 4 con el de las células de control.

En la presente memoria descriptiva, se usan como células de control células que se preparan a partir de la misma fuente que la de las células que van a evaluarse y cultivarse usando suero foráneo. El nivel de expresión del gen previsto en las células de control puede medirse simultáneamente con la medición del nivel en las células que van a evaluarse o puede medirse de antemano. Específicamente, el método de evaluación según la presente memoria descriptiva puede comprender además la etapa de medir el nivel de expresión del gen previsto en las células de control.

Aplicando la presente divulgación al gen descrito en la caja B de las tablas 2 a 4 como gen previsto, se determina que las células que van a evaluarse son células disponibles para su uso en reparación y regeneración de tejido biológico cuando el nivel de expresión del gen previsto en estas células es menor que en las células de control. De forma alternativa, aplicando la presente divulgación al gen descrito en la caja A de las tablas 2 a 4 como gen previsto, se determina que las células que van a evaluarse son células disponibles para su uso en reparación y regeneración de tejido biológico cuando el nivel de expresión del gen previsto en estas células es mayor que en las células de control.

En la presente memoria descriptiva, la medición del nivel de expresión del gen puede realizarse basándose en un nivel de ARNm o basándose en un nivel de proteína. Tal como se describió anteriormente, el “gen descrito en la tabla” que decir un gen identificado por “ID del conjunto de sonda” descrito en esta tabla (este gen incluye variantes que retienen las funciones del gen). Esto lo entienden fácilmente los expertos en la técnica basándose en el “título del gen” en la tabla. Por tanto, los expertos en la técnica pueden construir fácilmente herramientas de secuencia (por ejemplo, cebadores o pruebas) necesarias para la medición del nivel de ARNm y pueden obtener fácilmente los anticuerpos necesarios para la medición del nivel de proteína. Además, el método de evaluación según la presente memoria descriptiva puede realizarse basándose en el índice de que la razón del nivel de expresión del gen entre los alineamientos de referencia y experimental es de 4 veces o más en un sistema descrito en los presentes ejemplos.

El método de evaluación según la presente memoria descriptiva puede comprender la etapa de comparar la tasa de crecimiento de las células que van a evaluarse en presencia de suero alogénico con la tasa en presencia de suero foráneo. La presente divulgación es aplicable preferentemente a células derivadas de humanos. En este caso, el suero foráneo es preferentemente FBS. Se ha sabido previamente que el suero humano es significativamente inferior en actividad promotora del crecimiento a FBS y que presenta una actividad promotora del crecimiento celular insuficiente por sí mismo. Por tanto, es inesperado que si las células están disponibles o no para su uso en reparación y regeneración de tejido biológico pueda evaluarse comparando una tasa de crecimiento celular obtenida usando suero humano (particularmente, autosuero) con la obtenida usando FBS.

Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos para describir más específicamente el crecimiento celular según un método de la presente invención y una preparación farmacéutica para reparación/regeneración de tejido que comprende las células que se hicieron crecer mediante el método de la presente invención y que no pretenden limitar alcance de la presente invención de ninguna manera. Los expertos habituales en el campo de cultivo celular y/o terapia celular pueden hacer diversas modificaciones en los mismos.

Ejemplo 1

Se recogieron 60 ml de un fluido de médula ósea de un paciente con enfermedad cerebral usando un tubo de recogida de sangre cuya pared interna se humedeció de antemano con trazas de heparina (0,1 U por ml de fluido de médula ósea). Se añadió el fluido de médula ósea recogido a 210 ml de un medio para llevar la cantidad total a 270 ml. Esta disolución de cultivo que contenía fluido de médula ósea se dividió en 18 porciones, cada una de las cuales se sembró, a continuación, en una cantidad de 15 ml en una placa de 150 mm de diámetro (placa de cultivo tisular n.º 3030-150 fabricada por IWAKI). Se añadieron 5 ml del medio a la misma para llevar la cantidad total a 20 ml por placa. Tras la siembra, se dejan reposar estas placas en incubadoras separadas (9 placas por incubadora), seguido por cultivo a 37±0,5 ºC, en una atmósfera del 5 % de CO_2. Se confirmó de antemano mediante examen de sangre periférica que el fluido de médula ósea no estaba infectado con VIH, ATL, HB, HC, sífilis, parvovirus humano B19, y similares.

Se preparó el medio añadiendo 56,8 ml de suero derivado de sangre periférica autóloga, 5,7 ml de un antibiótico (que consiste en penicilina 10.000 U/ml y estreptomicina 10 mg/ml), y 5,7 ml de glutamina (292,3 mg/l) a 500 ml de un medio de Eagle modificado por Dulbecco, se esterilizó después por filtración, y se dividió en pequeñas porciones, que se almacenaron después en una caja de refrigeración a 4 ºC. Se mantuvo el medio a 37 ºC de antemano y después se usó.

En el día 4, se lavaron las células madre mesenquimatosas que se adherían al recipiente de cultivo. Para este fin, se separaron el medio y los componentes celulares de la sangre que flotan en el medio y se retiraron por succión, y se lavó posteriormente la superficie de las células madre mesenquimatosas adherentes seis veces con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato como lavado.

En el día 8, se realizó el primer subcultivo. Para este fin, se añadieron a la placa 4 ml de una disolución de separación (tripsina al 0,25 %-EDTA 2,21 mM) para disociar las células madre adherentes así lavadas con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato y se incubaron a 37 ºC durante 3 minutos para confirmar la disociación. Se añadió la misma cantidad de medio a la disolución de separación que contenía las células separadas de la placa, y se recogió la cantidad completa de la disolución por decantación. Las células correspondientes a las 9 placas se transfirieron respectivamente a 9 tubos de centrífuga y se centrifugaron a 800 rpm durante 5 minutos en una centrífuga. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante de cada tubo de centrífuga y se recogieron las células mediante la adición de DMEM. S centrifugó de nuevo la disolución de células recogida a 800 rpm durante 5 minutos. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante de cada tubo de centrífuga y se recogieron las células mediante la adición de 300 ml del medio. Se dividió esta disolución de células en pequeñas porciones correspondientes a las 15 placas y se incubaron para subcultivo a 37±0,5 ºC a una concentración del 5 % de CO_2, como en el cultivo primario. Se realizaron los mismos procedimientos de subcultivo que anteriormente para las 9 placas restantes.

En el día 13, se realizaron el lavado, la disociación y la centrifugación de la misma manera que antes. Se midió el número de células en cada pequeña parte usando un hemocitómetro y se determinó por consiguiente que alcanzó $1{,}1 \times 10^6$ células, y por tanto las células se subcultivaron adicionalmente. Se continuó el cultivo y, en el día 20, se midió el número de células de la misma manera que antes y se determinó por consiguiente que alcanzó $1{,}0 \times 10^8$ células en términos del número total. Por tanto, se realizaron el lavado, la disociación y la centrifugación y se suspendieron las células en una disolución de crioconservación (20,5 ml de RPMI habitual esterilizado por filtración, 20,5 ml de autosuero recogido del paciente, 5 ml de dextrano y 5 ml de DMSO) y se congeló a -150 ºC. La razón de células madre mesenquimatosas con respecto a las células fue del 98 % o más (positivas para CD105 (tasa positiva=99,9 %), negativas para CD34 (tasa negativa=98,8 %) y negativas para CD45 (tasa negativa=98,5 %).

Ejemplo comparativo 1

Se realizó el cultivo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 excepto porque el contenido de heparina en la muestra se cambió a 2 ml (267 U/ml). Los resultados se muestran en las figuras 1 y 2. Cuando se añadió heparina sólo en una cantidad traza (0,1 U/ml), se obtuvo un crecimiento hasta 8×10^5 células tras 4 días en cultivo. En cambio, cuando se añadieron 2 ml de heparina, se obtuvo un crecimiento hasta 2×10^4 células. Por tanto, la tasa de crecimiento obtenida usando trazas de heparina fue aproximadamente 40 veces mayor (figuras 1 y 2). En el cultivo continuado, el número de células aumentó tras 12 días en cultivo hasta $1{,}4 \times 10^7$ células mediante la adición de trazas de heparina y, en cambio, hasta $2{,}9 \times 10^6$ células mediante la adición de 2 ml de heparina (figura 1). Estos resultados muestran que la adición de heparina tiene efectos inhibidores sobre el crecimiento celular y también demuestran que el método de la presente invención puede hacer crecer las células rápidamente aún cuando se añade un anticoagulante en una cantidad traza o está sustancialmente ausente. Estos resultados muestran además que la tasa de crecimiento se mejora significativamente fijando la cantidad de heparina en una muestra a una cantidad traza.

Ejemplo comparativo 2

Se realizó el cultivo durante 8 días en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 excepto porque se usó FBS en vez de suero derivado de sangre periférica humana. En la figura 3 se muestra la comparación en la tasa de crecimiento de células madre mesenquimatosas basándose en la medición del número de células. Cuando se cultivaron células madre mesenquimatosas humanas en las condiciones de la presente invención, el uso de suero de adulto humano produjo tasas de crecimiento aproximadamente 2,6 veces mayores tras 5 días en cultivo y aproximadamente 6 veces mayores tras 8 días en el mismo que las obtenidas usando FBS. Estos resultados muestran que en el cultivo de células de médula ósea humanas, el uso de suero de adulto humano produce una tasa de crecimiento mayor que la obtenida usando FBS, fijando la cantidad de heparina en una muestra a una cantidad traza.

Ejemplo comparativo 3

Se realizó un experimento usando células madre mesenquimatosas de rata. Se cultivaron células de médula ósea recogidas de dos huesos de muslo de rata en el mismo medio que en el ejemplo 1 complementado con heparina 1 U/ml, 10 U/ml, 100 U/ml o 1000 U/ml. Se realizó el cultivo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 excepto porque se usó FBS en vez de suero derivado de sangre periférica humana. Los resultados se muestran en la figura 4. Estos resultados mostraron que una concentración mayor de heparina en un medio tiene mayores efectos inhibidores sobre el crecimiento.

Ejemplo comparativo 4

Se realizó un experimento usando células mesenquimatosas de rata tal como sigue: para un primer grupo, se extrajo un fluido de médula ósea de un hueso de muslo de rata usando 4 ml de DMEM para preparar una muestra de algo más de 4 ml en total. Se añadió esta muestra a 36 ml de DMEM complementado con 160 U de heparina, y se inició el cultivo. La concentración de heparina en el medio fue de 4 U/ml. Para un segundo grupo, se extrajo un fluido de médula ósea de un hueso de muslo de rata usando 4 ml de DMEM complementado con 160 U de heparina para preparar una muestra de algo más de 4 ml en total. Se dejó esta muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos en este estado en el que se expuso a la alta concentración de heparina. A continuación, se añadieron 36 ml de DMEM a la misma y se inició el cultivo. La concentración de heparina en el medio fue de 4 U/ml. Los cambios en el número de células para estos dos grupos se muestran en la figura 5. Se observó que el primer grupo tenía una tasa de crecimiento mucho más baja que la del segundo grupo. Estos resultados sugieren que la adición de heparina a una muestra celular durante la recogida de la muestra (o antes de cambiar a cultivo) produce una eficacia de crecimiento celular menor que la obtenida por la adición de heparina a un medio en el momento del cultivo.

Ejemplo 2

Se realizó el cultivo en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 excepto porque se usó un medio αMEM en vez de DMEM como medio convencional. Los resultados se muestran en la figura 6. Estos resultados demostraron que cuando se usó un medio αMEM, el uso de suero humano produce un crecimiento más rápido que el obtenido con FBS, reduciendo también la cantidad de heparina.

Ejemplo comparativo 5

Se realizó el cultivo durante 7 días de la misma manera que en el ejemplo 1 excepto porque el medio estaba libre de glutamina. La comparación en la tasa de crecimiento de células madre mesenquimatosas basándose en la medición del número de células se muestra en la figura 7. El uso de glutamina produjo una tasa de crecimiento de aproximadamente 1,6 veces mayor tras 1 semana en cultivo que la obtenida en ausencia de glutamina. Estos resultados muestran que se requiere la adición de glutamina para el crecimiento rápido de células madre mesenquimatosas.

Ejemplo 3

[Método]

Se recogieron tres huesos de muslo de rata, y se lavaron las células de médula ósea de cada hueso de muslo usando DMEM (5 ml) y complementado con los siguientes agentes para preparar tres grupos de muestras:

(i) DMEM (5 ml)

(ii) DMEM (5 ml) +heparina (2 μl)

(iii) DMEM (5 ml) +heparina (2 μl) +protamina (2 μl)

Se lavó cada muestra con DMEM y se colocaron en 10 ml de una disolución de cultivo (DMEM+FBS al 10 %+penicilina/estreptomicina al 1 %+L-glutamina 2 mM), que se sembró después en una placa de 10 cm y se cultivó durante 14 días. Se inició el subcultivo en el momento en que la densidad celular excedía 5.500 células/cm^2.

[Resultados]

Tal como se muestra en la figura 8, las células no tratadas con heparina tenían una cantidad inicial mayor y también una tasa de crecimiento mayor que las células tratadas con heparina, y esto fue obvio en los días de cultivo 8 a 11. Además, las células complementadas con protamina, una sustancia que inhibe la actividad de la heparina, tuvieron también una cantidad inicial baja y una tasa de crecimiento baja, como en las células tratadas con heparina.

Ejemplo 4

En condiciones en las que se cultivaron células sin contacto sustancial con heparina, es decir, en condiciones que implican una concentración de heparina baja, se compararon células madre mesenquimatosas cultivadas en autosuero con células madre mesenquimatosas cultivadas en FBS.

[Síntesis y purificación de ADNc]

Células madre mesenquimatosas cultivadas en un medio que contenía autosuero según el método del ejemplo 1 y células madre mesenquimatosas cultivadas en un medio que contenía FBS según el método del ejemplo comparativo 2 se ajustaron por separado a $1x10^7$ células/muestra. Se extrajo de cada muestra el ARN total usando el kit RNeasy Protect Min (QIAGEN, n.º de catálogo 74124). Para la rotura de células, se usó una trituradora QIA

(QIAGEN, n.º de catálogo 79654). Se ajustó la disolución de ARN obtenida a 0,5 mg/ml, y se comprobó la calidad del ARN usando el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Inc.).

Se sintetizó ADNc de primera hebra usando el kit de control de ARN poli-A eucariota GeneChip (AFFYMETRIX, Inc., P/N900433) y el kit mejorado con biotina MessageAmp II (Ambion, Inc., n.º de catálogo 1791). Específicamente, se añadió una disolución de reacción (II) a una disolución de reacción (I), se hicieron reaccionar a 70 ºC durante 10 minutos, y se hicieron reaccionar 20 μl en total del sistema de reacción a 42 ºC durante 2 horas.

[Fórmula 1]

Disolución de reacción (I)

ARN total (0,5 μg/μl)	2 μl
Controles de ARN poli-A diluido	2 μl
Cebador de T7-oligo(dT), 50μM	1 μl
Agua libre de ARNasa	7 μl
Total	12 μl

[Fórmula 2]

Disolución de reacción (II)

10xTampón de primera hebra	2 μl
Mezcla de dNTP	4 μl
Inhibidor de ARNasa	1 μl
ArrayScript	1 μl
Total	8 μl

Posteriormente, se sintetizó ADNc de segunda hebra y se purificó usando el kit mejorado con biotina MessageAmp II (Ambion, Inc., n.º de catálogo 1791). Específicamente, se añadió una disolución de reacción (III) a la disolución de reacción (II) así hecha reaccionar, y se hicieron reaccionar 100 μl en total del sistema de reacción a 16 ºC durante 2 horas. Para la purificación de ADNc, se usó el cartucho de filtro de ADNc incluido en el kit y finalmente se añadieron 24 μl de agua libre de nucleasa en dos partes al filtro para la elución.

[Fórmula 3]

Disolución de reacción (III)

Agua libre de nucleasa	63 μl
10xTampón de segunda hebra	10 μl
Mezcla d dNTP	4 μl
ADN polimerasa	2 μl
ARNasa H	1 μl
Total	80 μl

[Reacción IVT]

Se realizaron la reacción IVT y la purificación de ARNa usando el kit mejorado con biotina MessageAmp II (Ambion, Inc., n.º de catálogo 1791). Específicamente, se hizo reaccionar una disolución de reacción (IV) a 37 ºC durante 14 horas. A continuación, se terminó la reacción mediante la adición de 60 μl de agua libre de nucleasa. Para la purificación de ARNa, se usó el cartucho de filtro de ARNa incluido en el kit y finalmente se añadieron 100 μl de agua libre de nucleasa al filtro para la elución. Se ajustó la disolución de ARN obtenida a 20 μg/32 μl, y se comprobó la calidad del ARN usando un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Inc.)

[Fórmula 4]

Disolución de reacción IV

ADNc bicatenario	20 μl
Mezcla de NTP-Biotina	12 μl
10xTampón de reacción de T7	4 μl

Mezcla de enzimas de T7	4 μl
Total	40 μl

[Preparación del cóctel de hibridación]

Se fragmentó el ARNa usando el kit mejorado con biotina MessageAmp II (Ambion, Inc., n.º de catálogo 1791) para preparar el cóctel de hibridación. Específicamente, se hizo reaccionar una disolución de reacción (V) a 94 ºC durante 35 minutos. A continuación, se preparó el cóctel de hibridación usando el kit de control de hibridación con reactivos de amplificación en 3' GeneChip Expresión (AFFYMETRIX, Inc., P/N900454) y se hizo reaccionar a 99 ºC durante 5 minutos y después a 45 ºC durante 5 minutos.

[Fórmula 5]

Disolución de reacción V

ARNa (20 μg/μl)	32 μl
5x Tampón de fragmentación de alineamiento	8 μl
Total	40 μl

[Fórmula 6]

(Cóctel de hibridación)	
ARNc fragmentado	30 μl
Oligonucleótido de control B2	5 μl
20xControles de hibridación eucariotas	15 μl
ADN de esperma de arenque (10 mg/ml)	3 μl
BSA (50 mg/ml)	3 μl
2xTampón de hibridación*	150 μl
DMSO	30 μl
H_2O	64 μl
Total	300 μl

*Tampón de hibridación (1xconc.: MES100 mM, [Na^+] 0,1 M, EDTA 20 mM, Tween-20 al 0,01 %)

[Hibridación]

Se rellenó el alineamiento U133 Plus 2.0 de genoma humano de GeneChip (AFFYMETRIX, Inc., P/N900466) con 1xtampón de hibridación, seguido por prehibridación a 60 rpm a 45 ºC durante 10 minutos. A continuación, se retiró el 1xtampón de hibridación, y se rellenó el alineamiento con el cóctel de hibridación preparado, seguido por hibridación durante la noche a 60 rpm a 45 ºC.

[Lavado y tinción]

Se cargaron tampón de lavado A (6xSSPE, Tween-20 al 0,01 %), tampón de lavado B (MES 100 mM, [Na+] 0,1 M, Tween-20 al 0,05 %) y agua en el aparato Fluidics Station y se realizó el cebado según el programa de GCOS (software de funcionamiento de GeneChip). Posteriormente, se retiró el cóctel de hibridación y se rellenó el alineamiento con tampón de lavado A. Se cargaron este alineamiento, la mezcla de disolución SAPE (1xtampón de tinción, BSA 2 mg/ml, SAPE 10 μg/ml) y una mezcla de disolución de anticuerpo (1xtampón de tinción, BSA 2 mg/ml, disolución madre de IgG de cabra 0,1 mg/ml, anticuerpo biotinilado 3 mg/ml) en el aparato Fluidics Station. A continuación, se realizaron el lavado y la tinción según el programa de GCOS.

[Barrido]

Se cargó el escáner de alineamiento de genes en el alineamiento y se realizaron el barrido y el análisis. Los resultados del análisis se muestran en las tablas 1 a 5.

[Tabla 1]

Expresión de antígenos de superficie celular (antígenos CD)		
Positivos	Negativos	
CD9	CD1	CD72
CD29	CD4	CD74
CM44	CD5	CD79
CD47	CD6	CD84
CD58	CD7	CD86
CD59	CD8	CD93
CD63	CD14	CD96
CD73	CD19	CD117
CD81	CD22	CD133
CD97	CD21	CD163
CD99	CD28	CD177
CD105	CD33	CD180
CD109	CD34	CD207
CD151	CD37	CD209
CD157	CD38	CD226
CD164	CD45	CD244
CD166	CD48	CD247
CD200	CD53	CD274
CD248	CD68	CD300
	CD69	

[Tabla 2]

Expresión de factores relacionados con el factor de crecimiento A. Grupo de genes con expresión aumentada (FBS=>autosuero)	
Título del gen	Símbolo del gen
de tipo sinaptotagmina 4 (granufilina a)	SYTL4
regulador de la señalización de la proteína G 10	RGS10
regulador de la señalización de la proteína g 2, 24 kDa	RGS2
B. Grupo de genes con expresión disminuida (FBS=>autosuero)	
Título del gen	Símbolo del gen
receptor activado por proliferadores de peroxisomas delta	PPARD
protocadherina beta 14	PCDHB14
protocadherina beta 2	PCDHB2
molécula de adhesión de la unión 3	JAM3
molécula de adhesión de la unión 3	JAM3
familia de dominio a asociación RAS (RalGDS/AF-6) 8	RASSF8
proteína de unión PPAR	PPARBP
protocadherina beta 10	PCDHB10

ribonucleótido reductasa M2 B (TP53 inducible)	RRM2B
factor de crecimiento derivado de plaquetas D	PDGFD
de tipo activador de proteínas RAS 2	RASAL2
efector de apoptosis PERP. TP53	PERP
homólogo de dickkopi 3 (*Xenopus laevis*)	DKK3
molécula de adhesión de la unión 3	JAM3
homólogo de flightless I (*Drosophila*)	FL11
sinaptotagmina XI	SYT11
inhibidor de la unión a ADN 3, proteína hélice-bucle-hélice negativa dominante	ID3
factor de crecim. transf., receptor beta I (cinasa de activina A tipo II-tipo cinasa, 53 kDa)	TGFBR1
cadherina 6, tipo 2, cadherina K (riñón fetal)	CDH6
proteína asociada al tumor de Wilms 1	WTAP
proteína de unión a MYC 2	MYCBP2
molécula de adhesión celular a leucocitos activada	ALCAM
molécula de adhesión celular a leucocitos activada	ALCAM
lumican	LUM
inhibidor de la unión a ADN 2, proteína hélice-bucle-hélice negativa dominante /// inhibidor de la unión a ADN 2B, proteína hélice-bucle-hélice negativa dominante	ID2 /// ID2B
inhibidor de la unión a ADN 2, proteína hélice-bucle-hélice negativa dominante	ID2
proteína de unión a MYC 2	MYCBP2
catenina (proteína asociada a cadherina), beta 1, 88 kDa	CTNNB1

[Tabla 3]

Expresión de citocinas relacionadas A. Grupo de genes con expresión aumentada (FBS => autosuero)	
Título del gen	Símbolo del gen
proteína de unión a ARNm 2, factor de crecimiento 2 de tipo insulina	IGF2BP2
factor de crecimiento derivado de hepatoma, proteína relacionada 3	HDGFRP3
factor de crecimiento derivado de hepatoma, proteína relacionada 3	HDGFRP3
factor de crecimiento epidérmico (beta-urogastrona)	EGF
B. Grupo de genes con expresión disminuida (FBS => autosuero)	
Título del gen	Símbolo del gen
factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina	HBEGF
meteorina, de tipo regulador de diferenciación de células gliales /// similar a meteorina, de tipo regulador de diferenciación de células gliales	LOC653506 /// METRNL
factor derivado de células estromales 4	SDF4
receptor de quimiocina 7 (motivo C-X-C)	CXCR7

proteína de unión 3 a factor de crecimiento de tipo insulina	IGFBP3
proteína de unión 5 a factor de crecimiento de tipo insulina	IGFBP5
proteína de unión 5 a factor de crecimiento de tipo insulina	IGFBP5
factor de crecimiento de fibroblastos 7 (factor de crecimiento de queratinocitos)	FGF7
factor de crecimiento de tipo EGF de unión a heparina	HBEGF
proteína de unión 5 a factor de crecimiento de tipo insulina	IGFBP5
familia de portador de soluto 1 (transportador de glutamato de alta afinidad glial), miembro 3	SLCIA3
factor de crecimiento de tipo insulina 2 (somatomedina A)	IGF2
proteína de unión 4 a factor de crecimiento de tipo insulina	IGFBP4
factor de crecimiento de fibroblastos 7 (factor de crecimiento de queratinocitos)/// proteína 1 de tipo factor de crecimiento de queratinocitos///proteína 2 de tipo factor de crecimiento de queratinocitos	FGF7 /// KGFLP1 /// KGFLP2

[Tabla 4]

Grupo de genes cuyo nivel de expresión difirió dos veces o mas A. Grupo de genes con expresión aumentada (FBS=>autosuero)	
Título del gen	Símbolo del gen
de tipo mastermind 3 (*Drosophila*)	MAML3
proteína de unión a FK506 5	FKBP5
proteína de unión a FK506 5	FKBP5
1 ligado a X, expresado en el cerebro	BEX1
dominio de metalopeptidasa ADAM 19 (meltrina beta)	ADAM19
factor de crecimiento epidérmico (beta urogastrona)	EGF
fibrilina 2 (aracnodactilia contractural congénita)	FBN2
B. Grupo de genes con expresión disminuida (FBS=> autosuero)	
Título del gen	Símbolo del gen
locus transcrito, fuertemente similar a la proteína hipotética XP_001142613.1 [*Pan troglodytes*]	---
gremlina 2, superfamilia del nudo de cisteína, homóloga *(Xenopus laevis)*	GREM2
metalopeptidasa ADAM con trombospondina de tipo 1 motivo 5 (agrecanasa 2)	ADAMTS5
metalopeptidasa ADAM con trombospondina de tipo 1 motivo 5 (agrecanasa 2)	ADAMTS5
1 que contiene dominio de fibronectina tipo III	FNDC1
gremlina 2, superfamilia del nudo de cisteína, homóloga (*Xenopus laevis*)	GREM2
filagrina	FLG
proteína asociada microfibrilar 5	MFAP5
receptor de quimiocina 7 (motivo C-X-C)	CXCR7
proteína hipotética	DKFZP686A01247
proteína hipotética	DKFZP686A01247

queratina 17	KRT17
ácido fosfatídico fosfatasa tipo 2B	PPAP2B
proteína de unión 5 a factor de crecimiento de tipo insulina 5	IGFBP5
proteína de unión 5 a factor de crecimiento de tipo insulina 5	IGFBP5
prostaglandina E sintasa	PTGES
ácido fosfatídico fosfatasa tipo 2B	PPAP2B
inhibidor de la unión a ADN 3, proteína hélice-bucle-hélice negativa dominante	ID3
prostaglandina E sintasa	PTGES
miembro de la familia SMAD 6	SMAD6
factor de crecimiento de fibroblastos 7 (factor de crecimiento de queratinocitos)	FGF7
proteína de la matriz oligomérica de cartílago	COMP
secretogranina II (cromogranina C)	SCG2
hemo oxigenasa (desciclación) 1	HMOX1
proteína de unión 5 a factor de crecimiento de tipo insulina 5	IGFBP5
factor de crecimiento de tipo insulina 2 (somatomedina A)	IGF2
integrina, alfa 6	ITGA6
inhibidor de la unión a ADN 2, proteína hélice-bucle-hélice negativa dominante/// inhibidor de la unión a ADN 2B, proteína hélice-bucle-hélice negativa dominante	ID2 /// ID2B
inhibidor de la unión a ADN 2, proteína hélice-bucle-hélice negativa dominante	ID2
metalopeptidasa ADAM con trombospondina tipo 1 motivo 5 (agrecanasa 2)	ADAMTS5

[Resultados]

La tabla 1 muestra antígenos de superficie celular que presentaban un nivel aumentado o disminuido en común en 5 casos que implican a las células cultivadas en FBS y las células cultivadas en autosuero. La tabla 2 muestra factores relacionados con factores de crecimiento que presentaban expresión aumentada o disminuida en común en estos 5 casos. Además, la tabla 3 muestra citocinas que presentaban expresión aumentada o disminuida en común en estos 5 casos. Además, la tabla 4 muestra un grupo de genes cuyo nivel de expresión difirió en dos veces o más en común en estos 5 casos.

Tal como se muestra en la tabla 1, el marcador de diferenciación CD24 expresado en las células cultivadas en FBS no se expresó en las células cultivadas en autosuero, demostrando que las células cultivadas en autosuero mantuvieron un estado más indiferenciado. Además, tal como se muestra en las tablas 2 a 4, se expresaron una serie de factores de crecimiento en las células cultivadas en autosuero, y algunos factores de crecimiento presentaban expresión aumentada, en comparación con las células cultivadas en FBS. Además, los resultados del presente análisis demostraron que las células cultivadas en autosuero tienen baja expresión del grupo de una serie de genes relacionados con el cáncer y son por tanto altamente seguras.

Se confirmó por tanto que el método de cultivo de la presente invención que usa autosuero puede cultivar células con alta eficacia de crecimiento sin usar FBS y produce células que tienen mayor seguridad y mayor potencia de diferenciación.

Ejemplo 5

Un paciente (hombre de 52 años de edad) con enfermedad neurológica isquémica (infarto cerebral: oclusión de la arteria carótida interna derecha) desarrolló parálisis en el lado izquierdo el 4 de febrero de 2007 y fue transferido al hospital universitario médico de Sapporo el 19 de febrero de ese año. Antes de tratamiento, el paciente tuvo síntomas: estaba paralizado del lado derecho y tenía parálisis severa particularmente en la extremidad superior; no podía apretar y relajar su puño en absoluto; no podía sujetar y soltar un objeto (bloque de construcción, etc.); no podía levantar el brazo por encima del hombro; y no podía flexionar y extender su muñeca. Se recogieron de este paciente células madre mesenquimatosas y se hicieron crecer tal como se describe en el ejemplo 1. Se añadió una disolución de crioconservación (20,5 ml de RPMI habitual esterilizado por filtración, 20,5 ml de autosuero recogido del paciente, 5 ml de dextrano, y 5 ml de DMSO) a la cantidad total de las mismas para producir un fármaco

terapéutico. Se confirmó de antemano mediante examen de la sangre periférica que el fluido de médula ósea del paciente no estaba infectado con VIH, ATL, HB, HC, sífilis, parvovirus humano B19 y similares. Este fármaco terapéutico se administró al paciente por vía intravenosa a lo largo de 30 minutos el 19 de marzo. No se observó ningún efecto secundario.

Resultados

Este paciente tenía disfunción motora en los cinco dedos de la mano izquierda antes de la terapia celular y, sin embargo, a la mañana siguiente de la administración de las células, fue capaz de mover los dedos totalmente inmóviles de la mano izquierda y de apretar y relajar el puño. Una semana más tarde, se observó una mejora en la función motora y fue capaz de realizar la actividad física de llevar un palo. Dos semanas más tarde, se confirmó una reducción evidente en el tamaño del infarto cerebral mediante IRM (figura 10). Además, fue capaz de apretar y relajar el puño más rápido y de sujetar y soltar un bloque de construcción. También fue capaz de levantar el brazo por encima del hombro y adoptar la postura “banzai” (echar los brazos al aire). También fue capaz de flexionar y extender su codo y muñeca. Los cambios en el nivel de infarto cerebral de este paciente durante el periodo que se centra en la terapia celular se muestran en la figura 11 usando escalas bien conocidas la evaluación del infarto cerebral (NIHSS: *National Institutes of Health Stroke Scale* (escala de accidente cerebrovascular de los institutos nacionales de salud), JSS: *Japan Stroke Scale* (escala de accidente cerebrovascular japonesa) y MRS: *Modified Ranking Scale* (escala de clasificación modificada))

La figura 10 es una imagen de IRM del cerebro de este paciente. Se observó una reducción en el tamaño del sitio (parte blanca) dañado por infarto cerebral en el hemisferio derecho del cerebro. Además, la figura 12 es una imagen del torrente sanguíneo cerebral de este paciente, en la que se observó una recuperación en el torrente sanguíneo cerebral en el sitio de lesión tras 1 semana de tratamiento. Estos resultados, junto con la recuperación en la función motora mostrada anteriormente, demostraron que la administración de la presente preparación presenta efectos de mejora significativos en la fase subaguda o posterior. Estos resultados, junto con la recuperación en la función motora, demostraron que la administración de la preparación farmacéutica de la presente invención presenta efectos de mejora significativos sobre el infarto cerebral en la fase subaguda o posterior.

Ejemplo 6

Una paciente (mujer de cincuenta y tantos años) padecía oclusión espontánea del círculo de Willis (enfermedad de Moyamoya) durante un largo periodo y de ese modo desarrolló parálisis en el lado izquierdo. Se recogieron células madre mesenquimatosas de esta paciente y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1. Aproximadamente 2 meses tras el desarrollo, se administraron las células por vía intravenosa a esta paciente. Se confirmó una mejora en el torrente sanguíneo cerebral mediante examen de IRM (PWI) realizado tras la administración.

Ejemplo 7

Un paciente (hombre de sesenta y tantos años) desarrolló parálisis del lado izquierdo atribuida a aterotrombosis. Se recogieron células madre mesenquimatosas de este paciente y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1. Cuatro meses tras el desarrollo, se administraron las células por vía intravenosa a este paciente. Como resultado, se observó un alivio de la rigidez y el intervalo aumentado de movimiento articular desde el siguiente día de la administración. Posteriormente, recuperó significativamente la fuerza muscular para conseguir un nivel mensurable de potencia de agarre (4 kg). Además, aproximadamente 2,5 meses tras la administración, fue capaz de andar por sí mismo y recuperó la función de la mano izquierda hasta un nivel disponible de manera práctica.

Ejemplo 8

Un paciente (hombre de cincuenta y tantos años) desarrolló parálisis del lado izquierdo atribuida a aterotrombosis. Se recogieron células madre mesenquimatosas de este paciente y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1. Seis semanas tras el desarrollo, se administraron las células por vía intravenosa a este paciente. Como resultado, mejoró la movilidad de los dedos desde el día siguiente de la administración. Posteriormente, recuperó significativamente la fuerza muscular para conseguir un nivel mensurable de potencia de agarre (8 kg). Además, fue capaz de realizar tareas más finas más rápidamente y también recuperó la suficiente fuerza de las puntas de los dedos para, por ejemplo, separar un par de palillos chinos. Por tanto, fue capaz de realizar actividades útiles en la vida diaria.

Ejemplo 9

Un paciente (hombre de sesenta y tantos años) desarrolló parálisis del lado izquierdo atribuida a aterotrombosis. Se recogieron células madre mesenquimatosas de este paciente y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1. Cinco semanas tras el desarrollo, se administraron las células por vía intravenosa a este paciente. Como resultado, sintió una mejora principalmente en el movimiento de la extremidad inferior desde la noche del día de la administración y sintió una mejora incluso en el movimiento de la mano al día siguiente de la administración.

Posteriormente, la mejora en la función motora continuó.

Ejemplo 10

Un paciente (hombre de setenta y tantos años) desarrolló parálisis del lado izquierdo y alalia atribuida a infarto lacunar. Se recogieron células madre mesenquimatosas de este paciente y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1. Ocho semanas tras el desarrollo, se administraron las células por vía intravenosa a este paciente. Como resultado, fue capaz de mover los dedos de los pies desde la mañana siguiente a la administración, y también se observó mejora en el movimiento del hombro y el codo. A continuación, 3 días tras la administración, se recuperó lo suficiente como para mover los dedos.

Ejemplo 11

Se recogieron células madre mesenquimatosas de un paciente con diabetes mellitus crónica y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1 y se administraron por vía intravenosa a este paciente. Como resultado, su glucemia, que estaba alrededor de 190 mg/dl antes de la administración, mejoró hasta el nivel normal en aproximadamente 1 mes tras la administración. Además, se observó también una mejora evidente en otros índices para diabetes mellitus (figura 13).

Ejemplo 12

Se recogieron células madre mesenquimatosas de un paciente con hiperplasia prostática benigna, y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1 y se administraron por vía intravenosa a este paciente. Como resultado, la administración mejoró evidentemente el valor de PSA que sirve como índice para la hiperplasia prostática benigna con respecto a antes de la administración (figura 14).

Ejemplo 13

Se recogieron células madre mesenquimatosas de un paciente con daño hepático y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1 y se administraron por vía intravenosa a este paciente. Como resultado, la administración mejoró evidentemente los niveles de γ-GTP, GOT y GPT que sirven como índices para daño hepático con respecto a antes de administración (figura 15).

Ejemplo 14

Se recogieron células madre mesenquimatosas de un paciente con daño renal y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1 y se administraron por vía intravenosa a este paciente. Como resultado, la administración mejoró evidentemente el valor de β2-microglobulina que sirve como índice para daño renal con respecto a antes de la administración y también mejoró evidentemente otros índices para daño renal (valores de BUN y/o creatinina) (figura 16).

Ejemplo 15

Se recogieron células madre mesenquimatosas de un paciente con hiperlipidemia y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1 y se administraron por vía intravenosa a este paciente. Como resultado, la administración mejoró evidentemente el valor de grasa neutra que sirve como índice para hiperlipidemia con respecto a antes de la administración y también mejoró evidentemente otros índices para hiperlipidemia (figura 17).

Ejemplo 16

Se recogieron células madre mesenquimatosas de un paciente con disfunción cerebral/afasia mayor y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1 y se administraron por vía intravenosa a este paciente. Antes y después de la administración, se sometió al paciente a la prueba de lenguaje convencional de afasia (SLTA, *standard language test of aphasia*) y a la escala revisada de inteligencia de adultos de Wechsler (WAIS-R, *Wechsler adult intelligence scale-revised*). Como resultado, la administración mejoró evidentemente los valores de SLTA y WAIS-R con respecto a antes de la administración (figura 18).

Ejemplo 17

Se recogieron células madre mesenquimatosas de un humano sano y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1. Las células madre mesenquimatosas humanas se prepararon para modelos de infarto cerebral en rata (modelos de oclusión de la arteria cerebral media). Posteriormente, los modelos de rata se dividieron en (i) un grupo sin trasplante, (ii) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células ($1{,}0 \times 10^6$), (iii) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células transfectadas con el gen de angiopoyetina ($1{,}0 \times 10^6$), (iv) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células transfectadas con el gen de VEGF ($1{,}0 \times 10^6$) y (v) un grupo en el que se inyectaron por vía intravenosa células transfectadas con el gen de angiopoyetina/VEGF ($1{,}0 \times 10^6$), y, después, se

trataron y se estudiaron los efectos terapéuticos por comparación. Como resultado de examinar los efectos terapéuticos por IRM (figura 19A), los efectos terapéuticos se observaron en los grupos (ii), (iii) y (v) con la fuerza de los efectos terapéuticos en el orden de (v) > (iii) > (ii).

Además, como resultado de analizar los efectos terapéuticos de los aspectos de la angiogénesis (figura 19B), los efectos terapéuticos se observaron en los grupos (ii), (iii), (iv) y (v) con la fuerza de los efectos terapéuticos en el orden de (v) > (iii) > (iv) > (ii).

Además, como resultado de analizar los efectos terapéuticos usando la prueba de esfuerzo de cinta rodante de los aspectos de comportamiento (figura 20), los efectos terapéuticos se observaron en los grupos (ii), (iii) y (v) con la fuerza de los efectos terapéuticos en el orden de (v)>(iii)>(ii).

Ejemplo 18

Se recogieron células madre mesenquimatosas de un humano sano y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1. Las células madre mesenquimatosas humanas ($1{,}0x10^6$) se administraron por vía intravenosa a modelos de parada cardiorrespiratoria en rata, y se determinaron los efectos terapéuticos. El tratamiento suprimió la apoptosis (redujo el número de células positivas para Tunnel) (figura 21), y un gran número de células neuronales sobrevivieron (figura 22). Además, se evaluaron las funciones superiores del cerebro según la prueba del laberinto de agua de Morris. Como resultado, se observó una mejora en las mismas en el grupo tratado.

Ejemplo 19

Se recogieron células madre mesenquimatosas de un humano sano y se cultivaron de la misma manera que en el ejemplo 1. Se usó un impactador NYU para las médulas espinales (Th11) de ratas sometidas a laminectomía para preparar modelos de lesión de médula espinal. Tras 6 horas, 1 día, 3 días, 7 días o 14 días, se trasplantaron las células madre mesenquimatosas humanas ($1{,}0x10^6$) a través de la vena la femoral a los modelos de rata, y se evaluaron sus actividades a lo largo del tiempo con la prueba de cinta rodante. Específicamente, se diseñó de antemano un conjunto de cinta rodante en movimiento a una velocidad de 20 m/min para aplicar choque eléctrico a las ratas que dejaban de correr y se entrenaron a las ratas para que corriesen en sesiones de 20 minutos (al día) dos días a la semana desde antes de la creación del infarto cerebral. Se representó gráficamente el grado de recuperación dependiente del tiempo para cada grupo con el tiempo como eje de abscisas frente a la velocidad máxima como eje de ordenadas. Se observaron efectos terapéuticos marcados en los grupos que recibieron trasplante tras 6 horas o 1 día de la creación de la lesión de médula espinal (figura 23).

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en el presente documento se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

Aplicabilidad industrial

La presente invención consigue una rápida provisión de células madre mesenquimatosas humanas para su uso en un fármaco terapéutico que presenta efectos significativos sobre la reparación/regeneración de tejido. Esta rápida provisión del fármaco terapéutico tiene grandes efectos particularmente en enfermedades para las que una terapia celular temprana es eficaz, por ejemplo, en la regeneración de nervios cerebrales para un paciente que tiene un nervio cerebral dañado. Además, alivia la escasez de donantes de células y reduce su carga física. Una preparación farmacéutica producida mediante el método de la presente invención tiene efectos como un fármaco terapéutico, por supuesto. Además, la preparación farmacéutica mejora significativamente la QOL de pacientes debido a los efectos terapéuticos potenciados por la rápida provisión y también reduce la carga de cuidadores y el coste del cuidado, conduciendo a una reducción en la carga social. Por tanto, la presente invención arroja luz sobre el envejecimiento de la sociedad.

REIVINDICACIONES

1. Método para hacer crecer células madre mesenquimatosas humanas en una muestra recogida de un sujeto vivo cultivando las células en un medio, comprendiendo el método cultivar las células, sin contacto sustancial con un anticoagulante en cualquier punto de tiempo desde la recogida de células hasta todo el periodo de cultivo, en un medio que contiene suero humano, en el que la cantidad del anticoagulante añadido a la muestra recogida de un sujeto vivo es de menos de 0,2 U/ml con respecto al volumen de la muestra.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad del anticoagulante presente en el medio durante el cultivo de las células en la muestra recogida de un sujeto vivo es de menos de 0,02 U/ml con respecto al volumen del medio.

3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se ha determinado que el suero humano es negativo para un marcador tumoral sérico y/o un factor infeccioso.

4. Método según la reivindicación 3, en el que el marcador tumoral sérico es uno o más seleccionado del grupo que consiste en ferritina, CEA, AFP, BFP, CA125, CA15-3, CA19-9, CA72-4, STN, DUPAN-2, SLX, ST-439, SPAN-1, SCC, PSA, G-seminoproteína, TPA, CYFRA, PAP, NSE, péptido C, PIVKA, Pro-GRP, HCGβ, elastasa, β2 microglobulina, S-NTX, un anticuerpo anti-p53 y HER2.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el suero humano es autosuero.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticoagulante es heparina o un derivado de heparina.

7. Método según la reivindicación 6, en el que el derivado de heparina es glucosaminoglucano que puede obtenerse por desulfatación en la posición 6 de la D-glucosamina que constituye la heparina.

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el medio tiene un contenido en suero del 1 al 20% en volumen.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra se selecciona de sangre o fluido de médula ósea humana.

10. Método de producción células madre mesenquimatosas que comprende realizar el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y recoger las células madre mesenquimatosas del medio.

11. Células madre mesenquimatosas que pueden derivarse de fluido de médula ósea humana, caracterizadas porque expresan los antígenos de la superficie celular CD positivos y no expresan los antígenos de la superficie celular negativos enumerados en la siguiente tabla

Positivos	Negativos	
CD9	CD1	CD72
CD29	CD4	CD74
CD44	CD5	CD79
CD47	CD6	CD84
CD58	CD7	CD86
CD59	CD8	CD93
CD63	CD14	CD96
CD73	CD19	CD117
CD81	CD22	CD133
CD97	CD24	CD163
CD99	CD28	CD177
CD105	CD33	CD180
CD109	CD34	CD207
CD151	CD37	CD209
CD157	CD38	CD226

CD164	CD45	CD244
CD166	CD48	CD247
CD200	CD53	CD274
CD248	CD68	CD300
	CD69	

12. Composición farmacéutica para su uso en un método de reparación/regeneración de tejido, caracterizada porque comprende células madre mesenquimatosas según la reivindicación 11.

13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las células se crioconservan adicionalmente en una disolución de crioconservación para células madre mesenquimatosas humanas, en el que la disolución de crioconservación puede obtenerse añadiendo 20,5 ml de RPMI esterilizado por filtración y 20,5 ml de autosuero recogido del paciente, 5 ml de dextrano y 5 ml de DMSO.

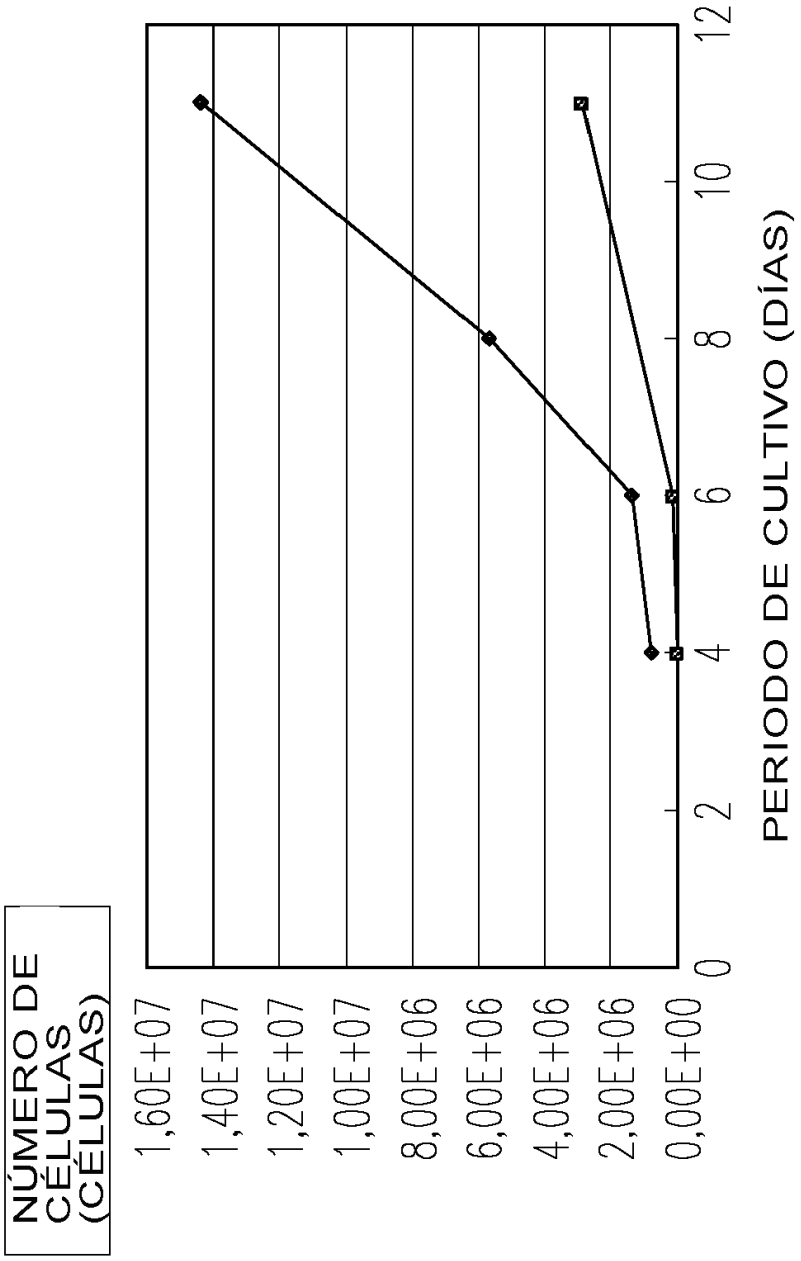
14. Método de crioconservación de células madre mesenquimatosas humanas, comprendiendo el método realizar el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, suspender las células en una disolución de crioconservación para células madre mesenquimatosas humanas que puede obtenerse añadiendo 20,5 ml de RPMI esterilizado por filtración y 20,5 ml de autosuero recogido del paciente, 5 ml de dextrano y 5 ml de DMSO y almacenar las células a -150ºC.

15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10,

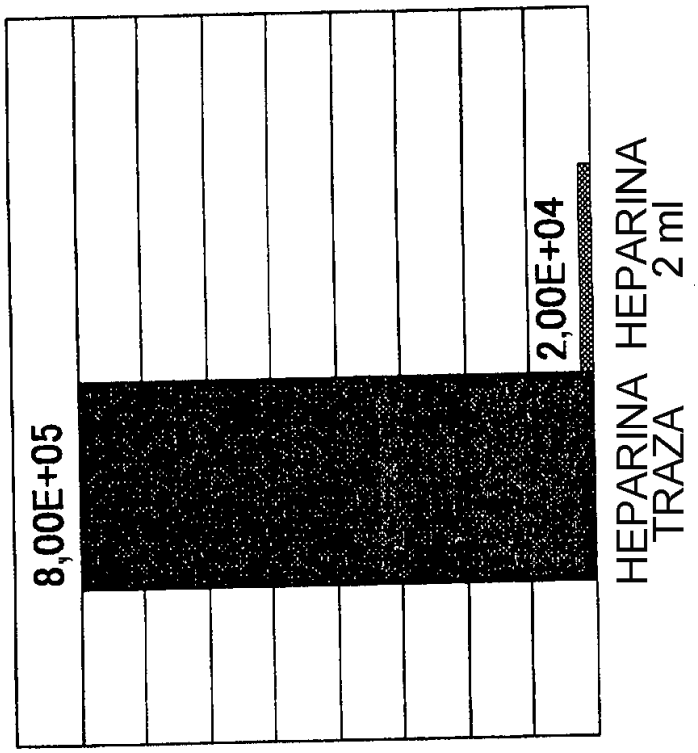
en el que se añade fluido de médula ósea recogido que comprende heparina 0,1 U/ml a un medio de recogida de médula ósea en una razón de 60 ml de fluido de médula ósea con respecto a 210 ml de medio de recogida de médula ósea,

en el que dicho medio de recogida de médula ósea puede obtenerse añadiendo 56,8 ml de suero derivado de sangre periférica autóloga, 5,7 ml de un antibiótico que consiste en penicilina 10.000 U/ml y estreptomicina 10 mg/ml y 5,7 ml de disolución de glutamina que tiene una concentración de 292,3 mg/l a 500 ml de un medio de Eagle modificado por Dulbecco, seguido de esterilización por filtración.

Fig. 1


NÚMERO DE CÉLULAS (CÉLULAS)
1,60E+07
1,40E+07
1,20E+07
1,00E+07
8,00E+06
6,00E+06
4,00E+06
2,00E+06
0,00E+00
0
2
4
6
8
10
12
PERIODO DE CULTIVO (DÍAS)

【Fig. 2】



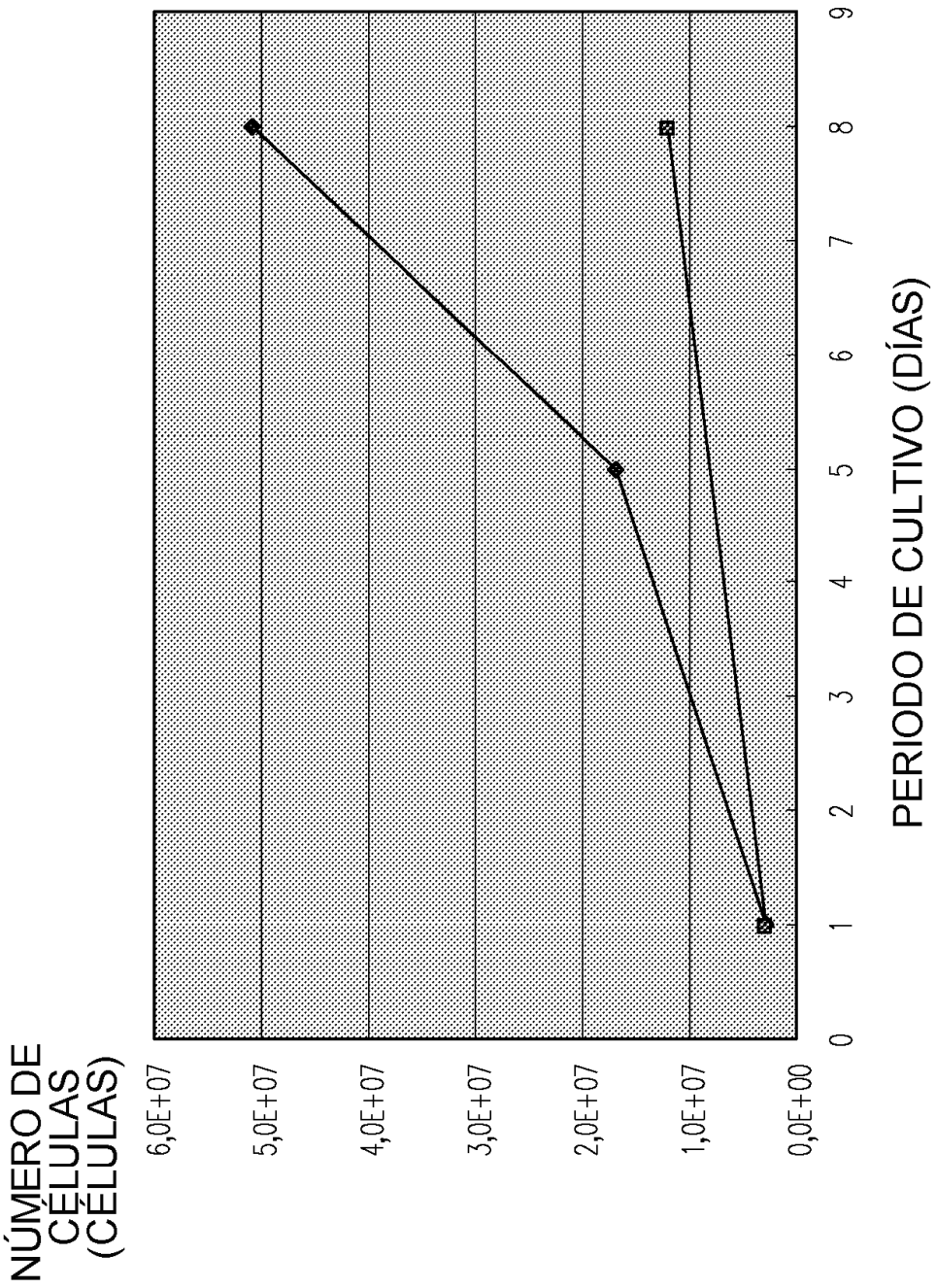

NÚMERO DE CÉLULAS (CÉLULAS)
6,0E+07
5,0E+07
4,0E+07
3,0E+07
2,0E+07
1,0E+07
0,0E+00
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
PERIODO DE CULTIVO (DÍAS)

Fig. 3

Fig. 4

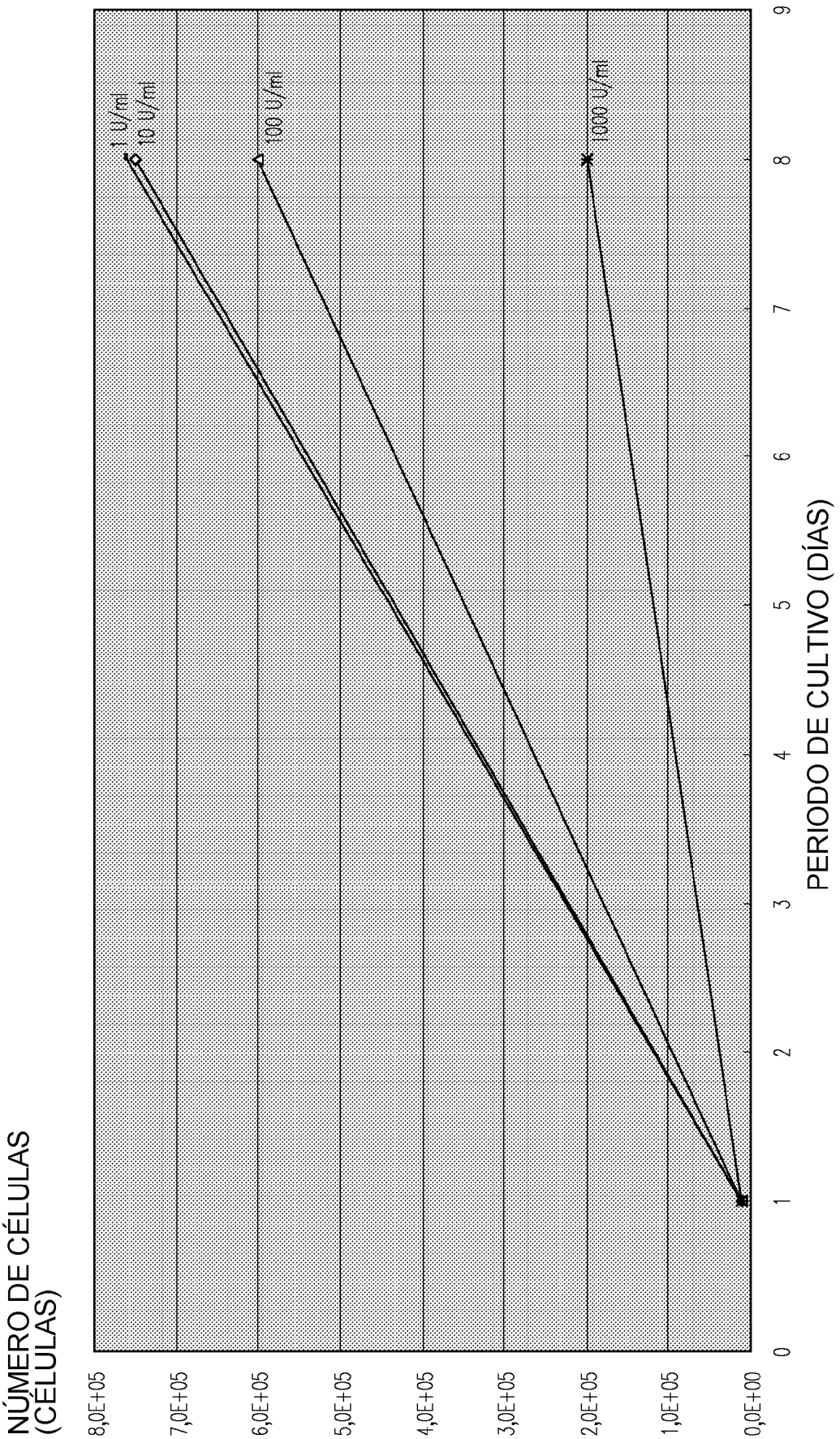
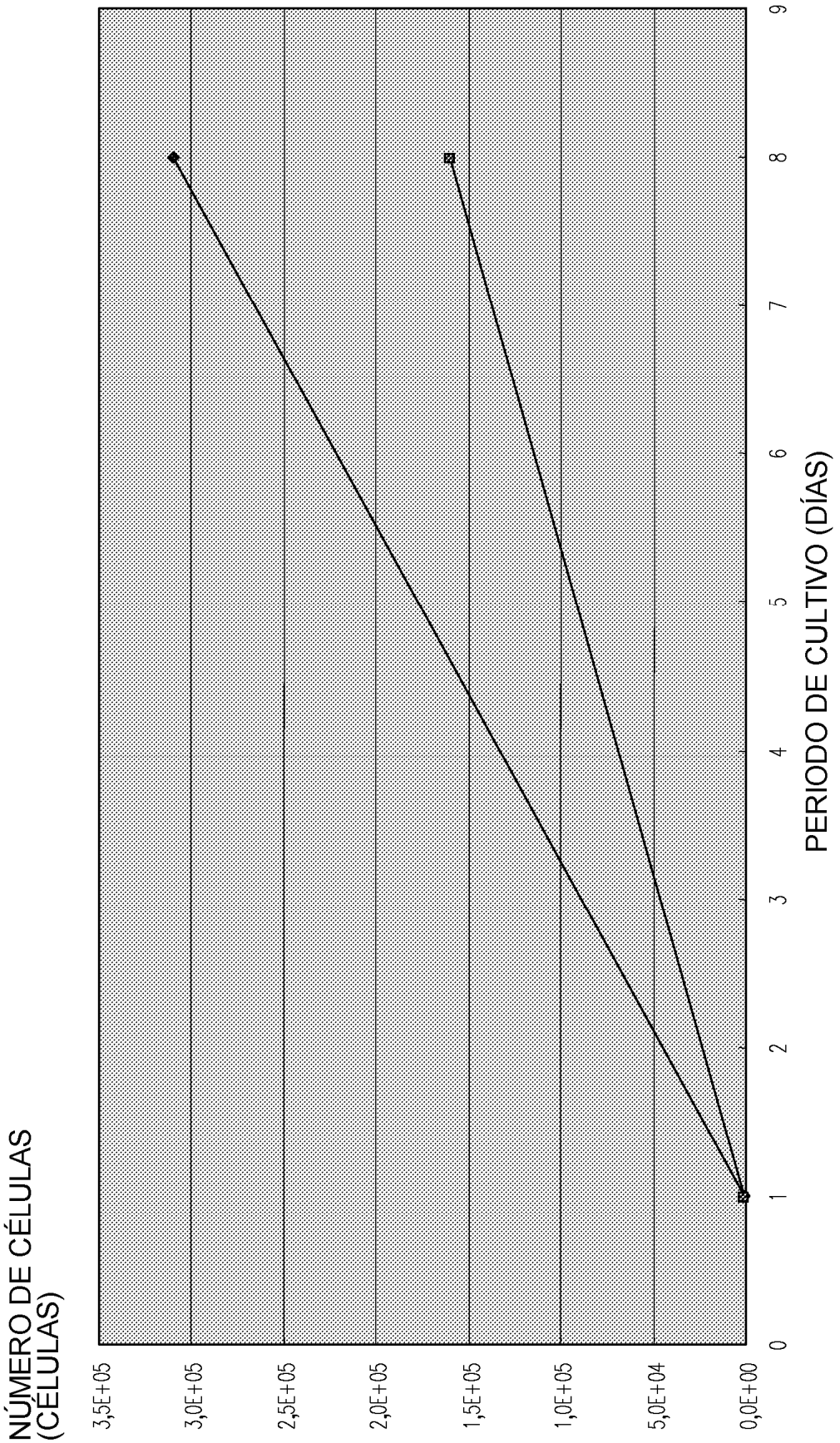

NÚMERO DE CÉLULAS
(CÉLULAS)
8,0E+05
7,0E+05
6,0E+05
5,0E+05
4,0E+05
3,0E+05
2,0E+05
1,0E+05
0,0E+00
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
PERIODO DE CULTIVO (DÍAS)
1 U/ml
10 U/ml
100 U/ml
1000 U/ml

Fig. 5


NÚMERO DE CÉLULAS
(CÉLULAS)
3,5E+05
3,0E+05
2,5E+05
2,0E+05
1,5E+05
1,0E+05
5,0E+04
0,0E+00
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
PERIODO DE CULTIVO (DÍAS)

【Fig. 6】

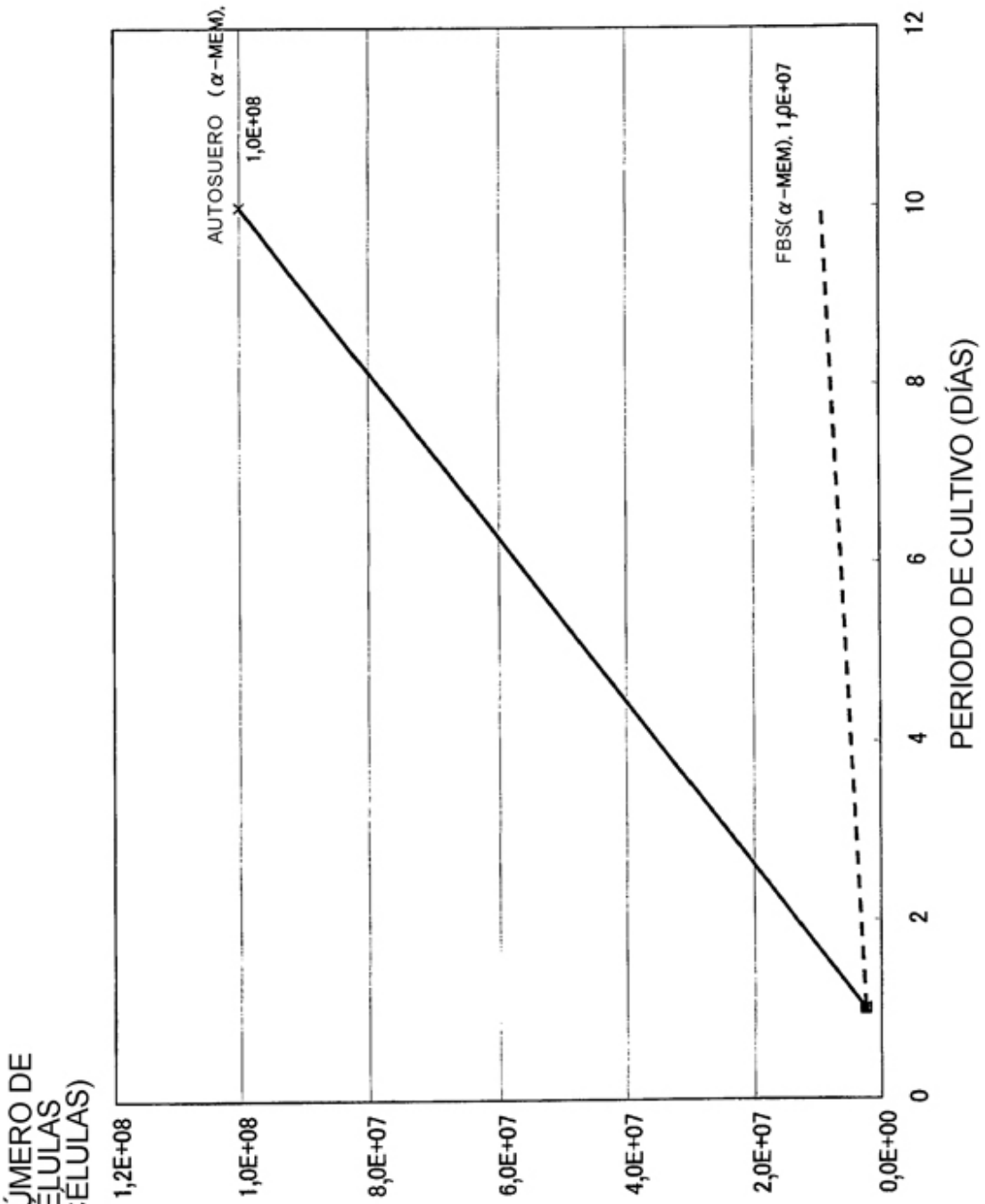

NÚMERO DE CÉLULAS (CÉLULAS)
1,2E+08
1,0E+08
8,0E+07
6,0E+07
4,0E+07
2,0E+07
0,0E+00
AUTOSUERO (α-MEM), 1,0E+08
FBS(α-MEM), 1,0E+07
0
2
4
6
8
10
12
PERIODO DE CULTIVO (DÍAS)

Fig. 7

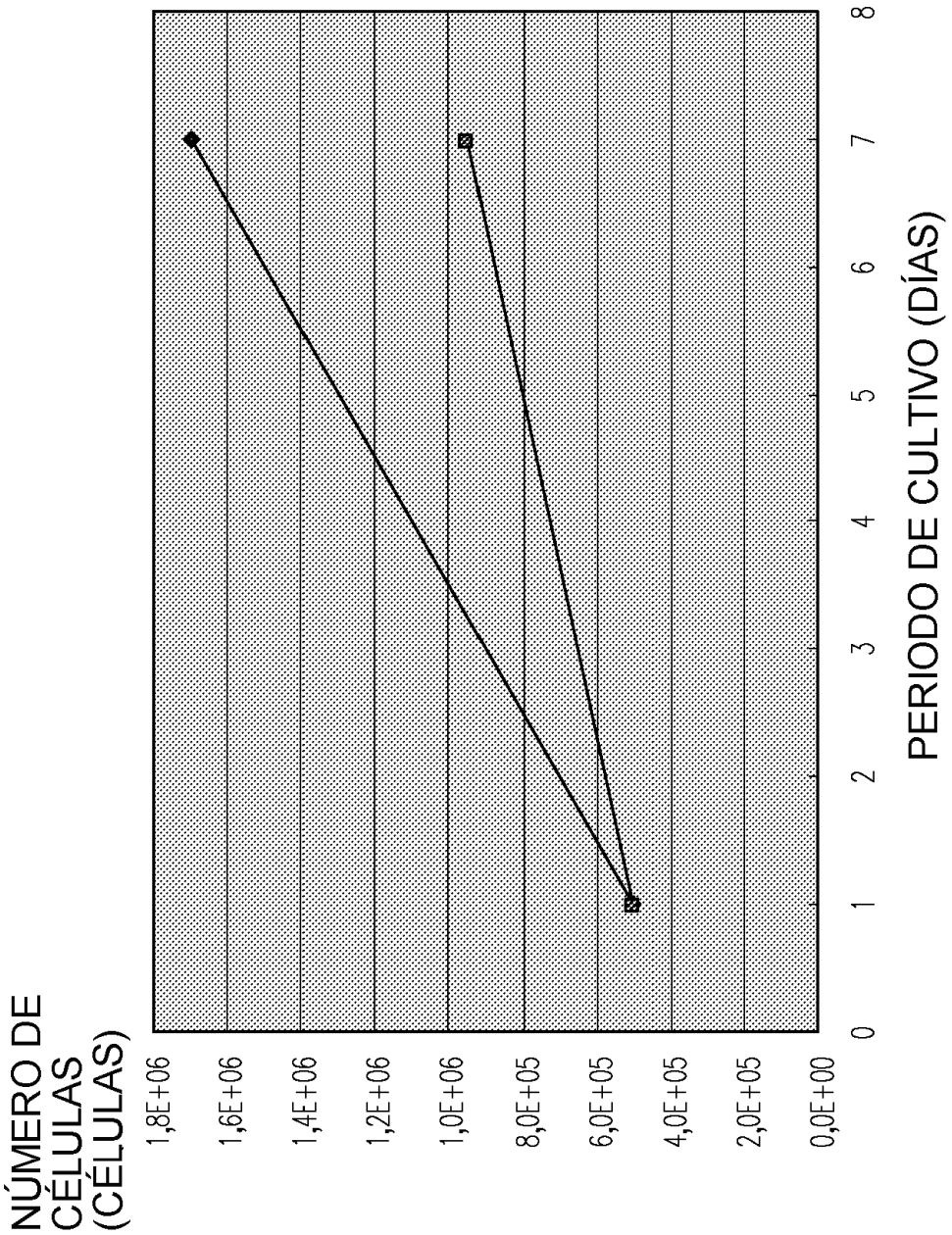

NÚMERO DE CÉLULAS (CÉLULAS)
1,8E+06
1,6E+06
1,4E+06
1,2E+06
1,0E+06
8,0E+05
6,0E+05
4,0E+05
2,0E+05
0,0E+00
0
1
2
3
4
5
6
7
8
PERIODO DE CULTIVO (DÍAS)

Fig. 8

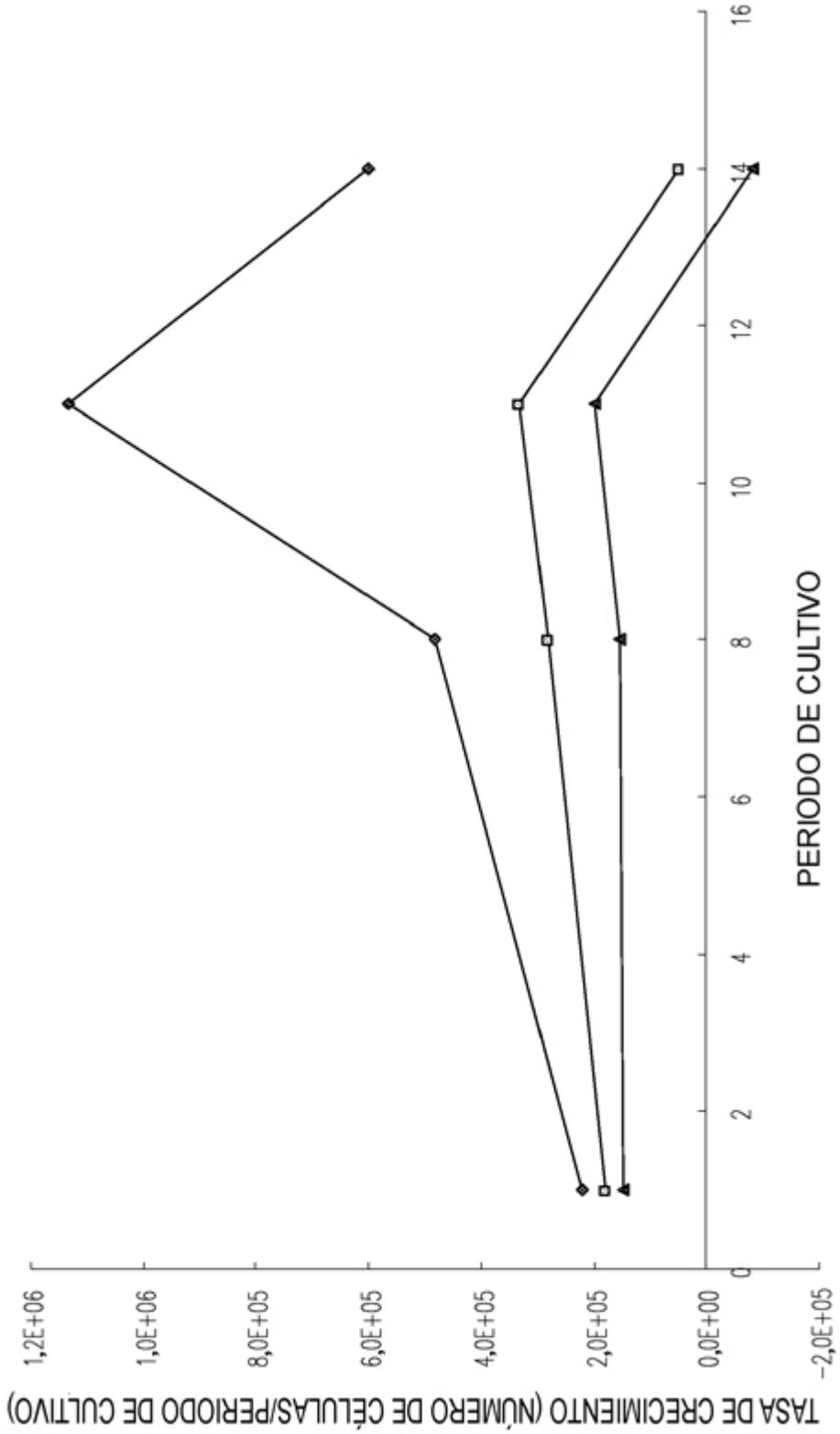
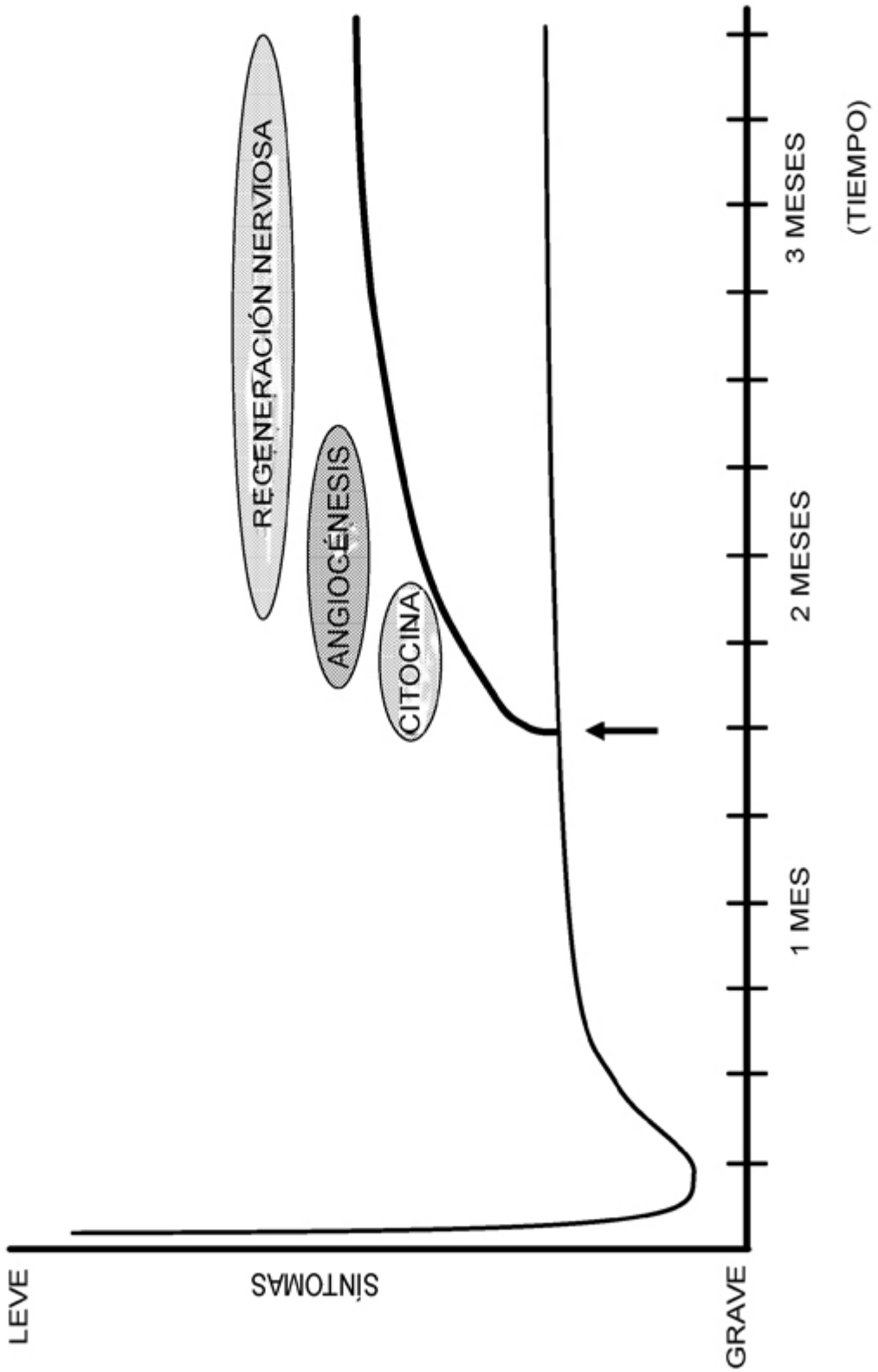
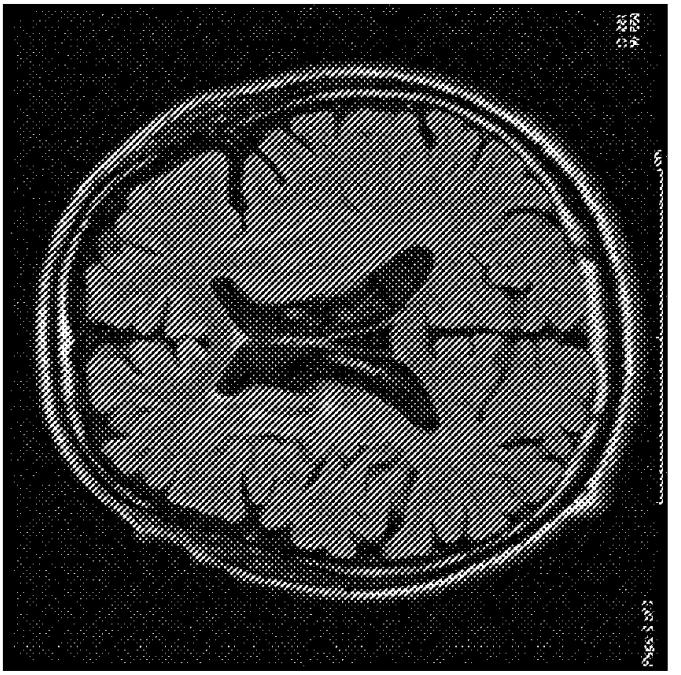

TASA DE CRECIMIENTO (NÚMERO DE CÉLULAS/PERIODO DE CULTIVO)
1,2E+06
1,0E+06
8,0E+05
6,0E+05
4,0E+05
2,0E+05
0,0E+00
−2,0E+05
0
2
4
6
8
10
12
14
16
PERIODO DE CULTIVO

Fig. 9


LEVE
SÍNTOMAS
GRAVE
REGENERACIÓN NERVIOSA
ANGIOGÉNESIS
CITOCINA
1 MES
2 MESES
3 MESES
(TIEMPO)



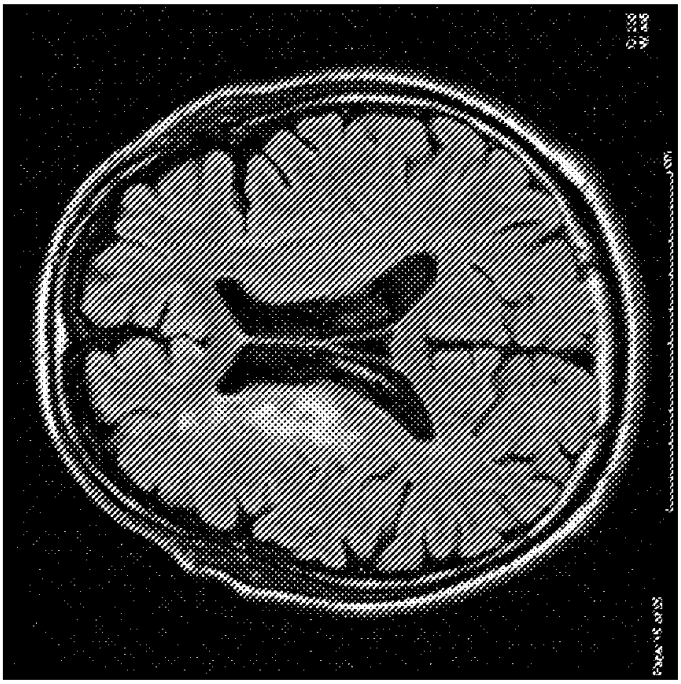
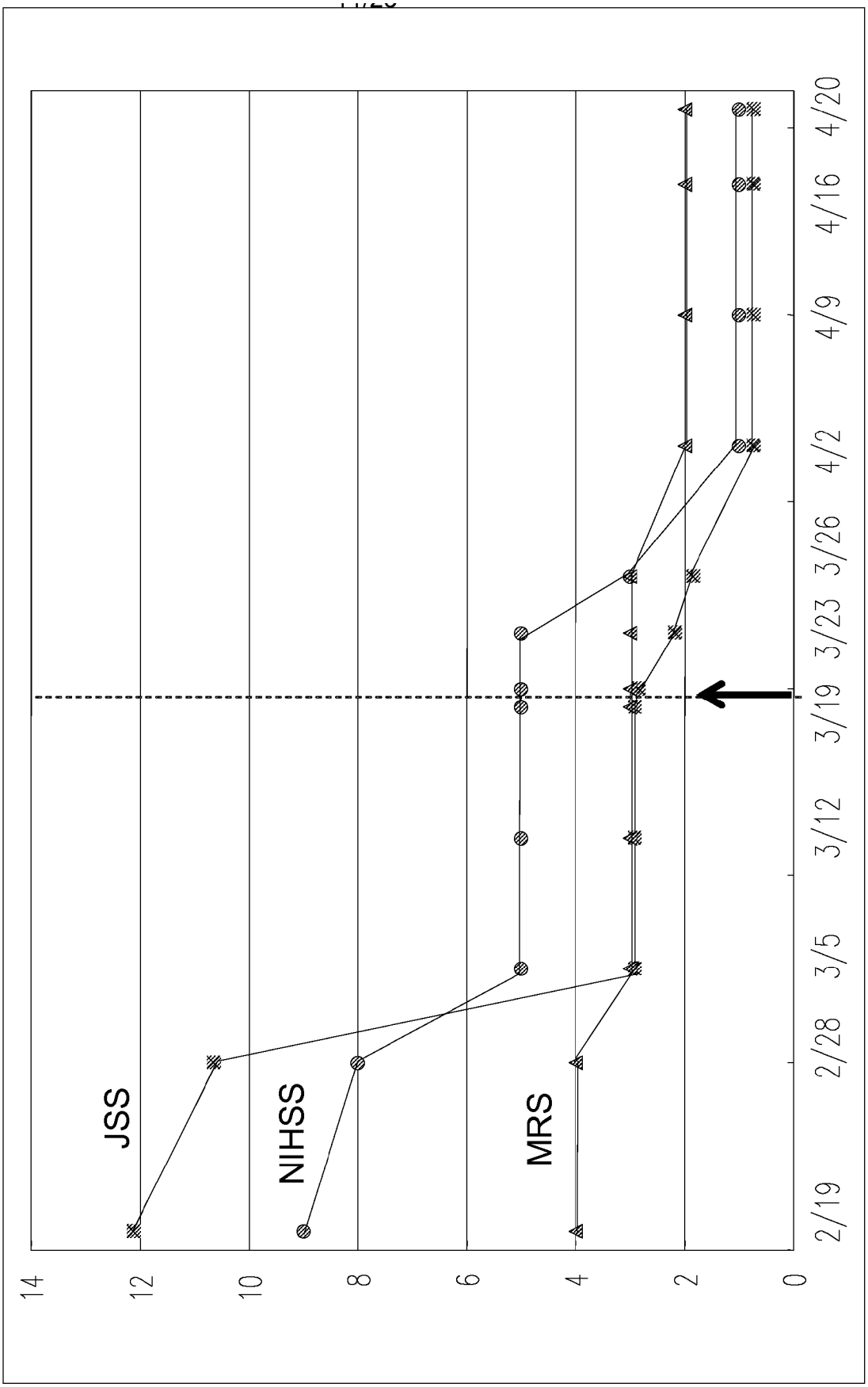
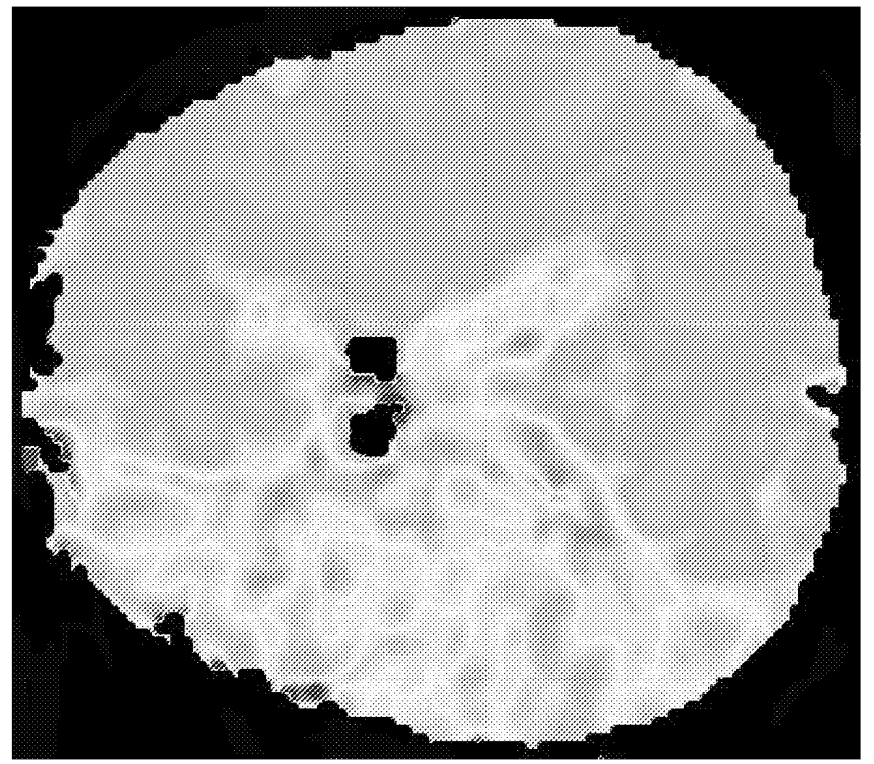


Fig.10

Fig.11


14
12
10
8
6
4
2
0
JSS
NIHSS
MRS
2/19
2/28
3/5
3/12
3/19
3/23
3/26
4/2
4/9
4/16
4/20



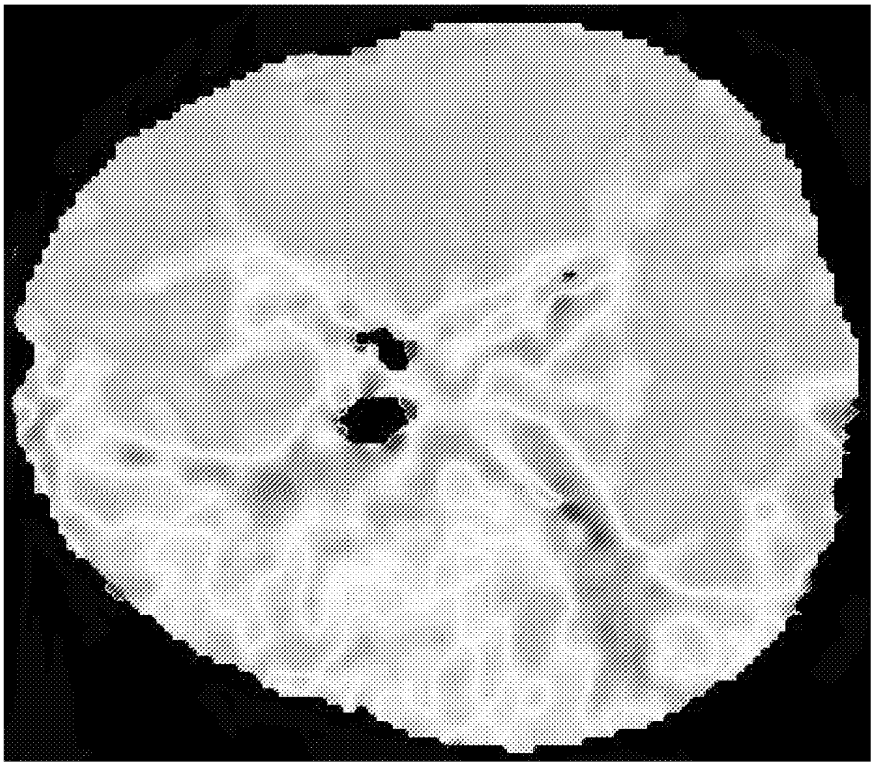


Fig. 12

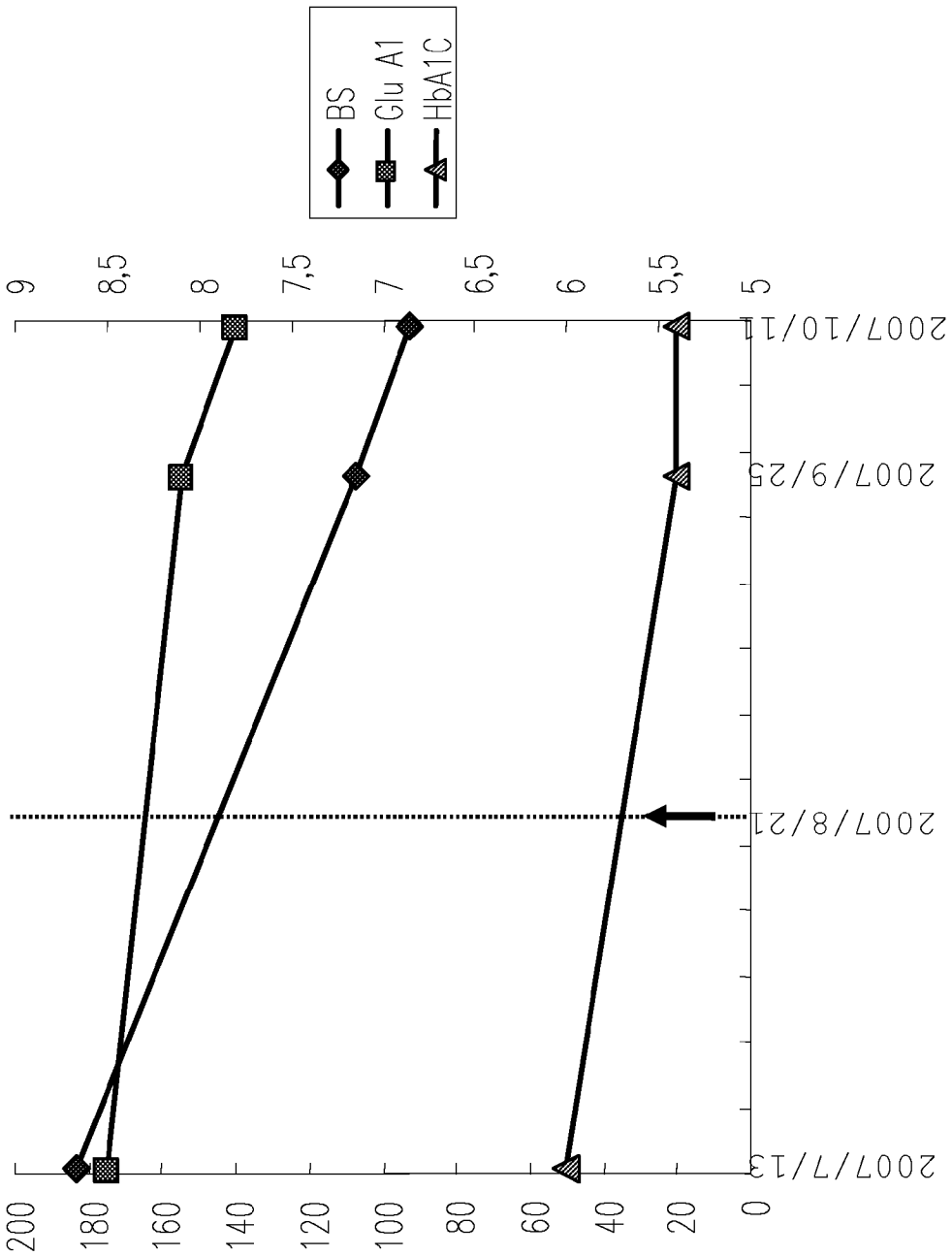
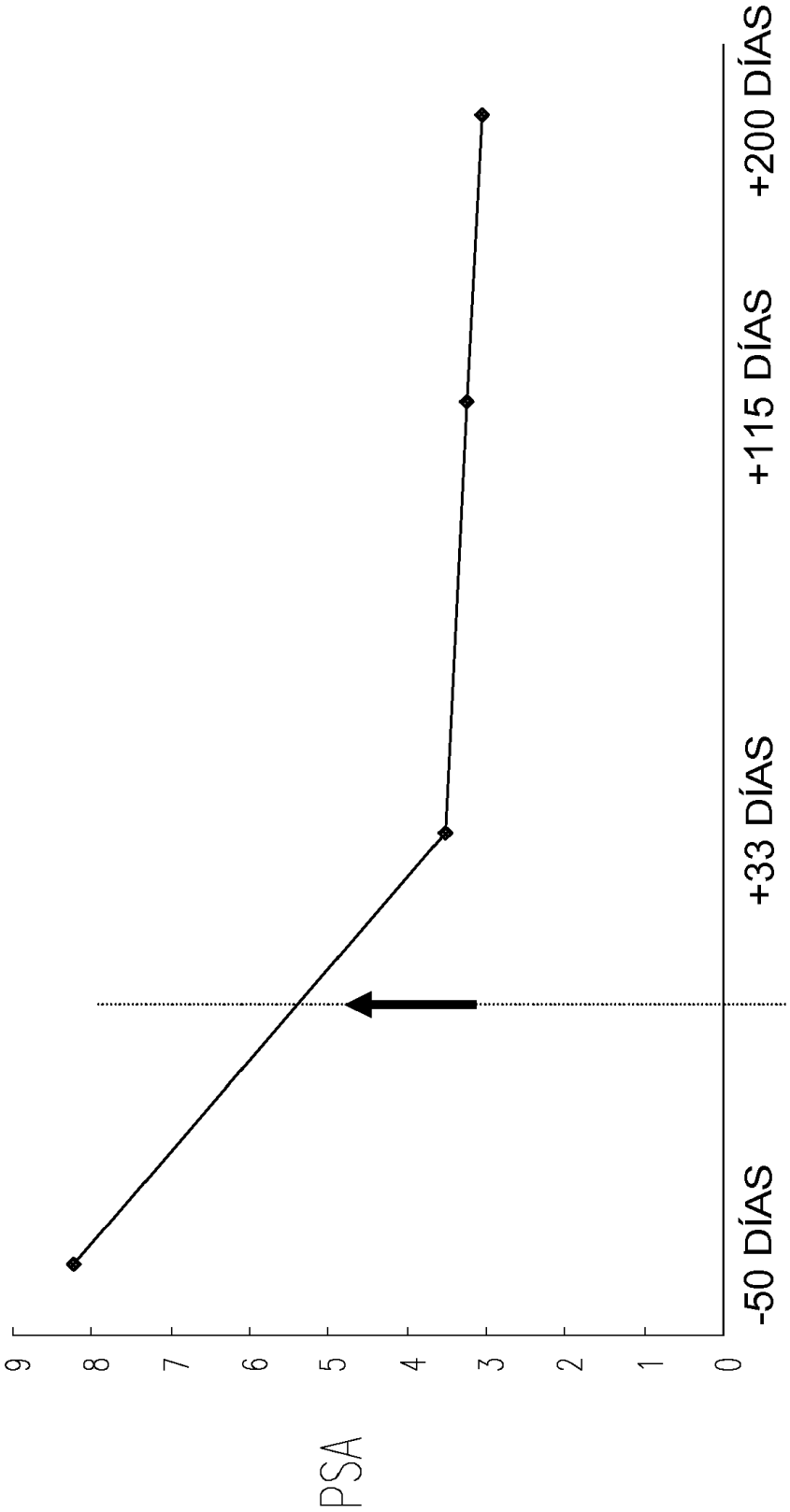

BS
Glu A1
HbA1C
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
9
8,5
8
7,5
7
6,5
6
5,5
5
2007/7/13
2007/8/21
2007/9/25
2007/10/11

Fig.13

Fig.14



【Fig.15】

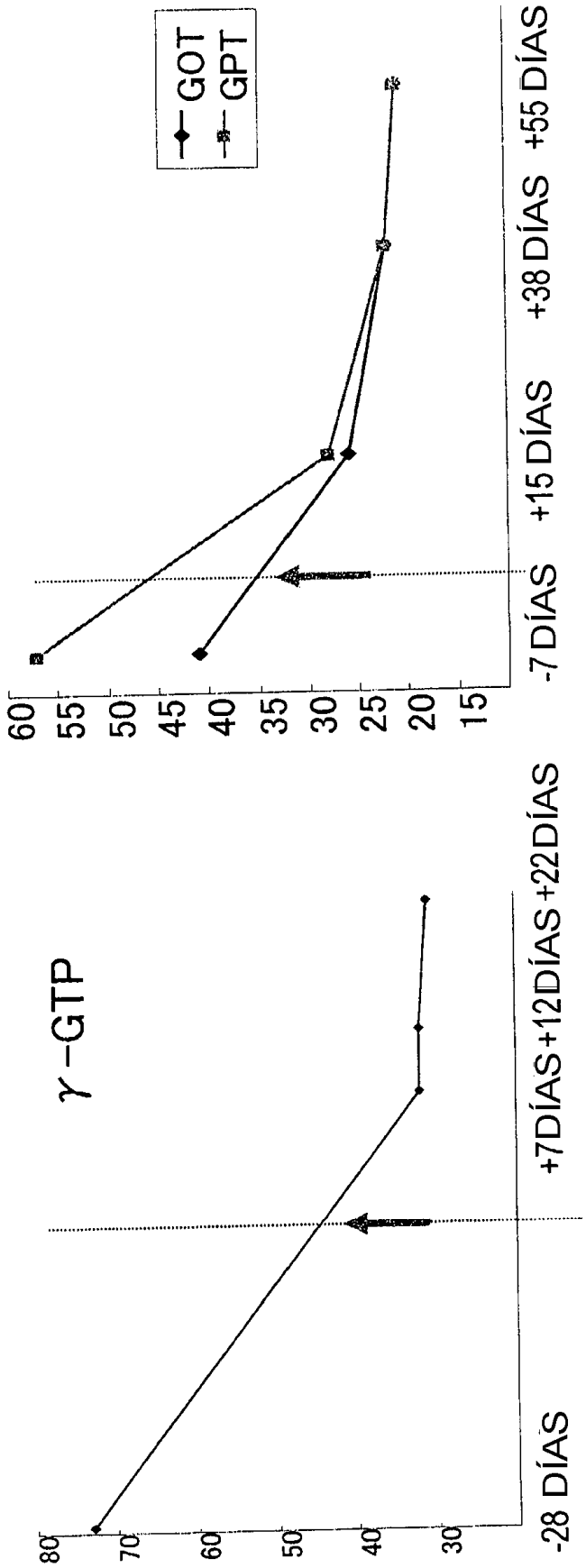
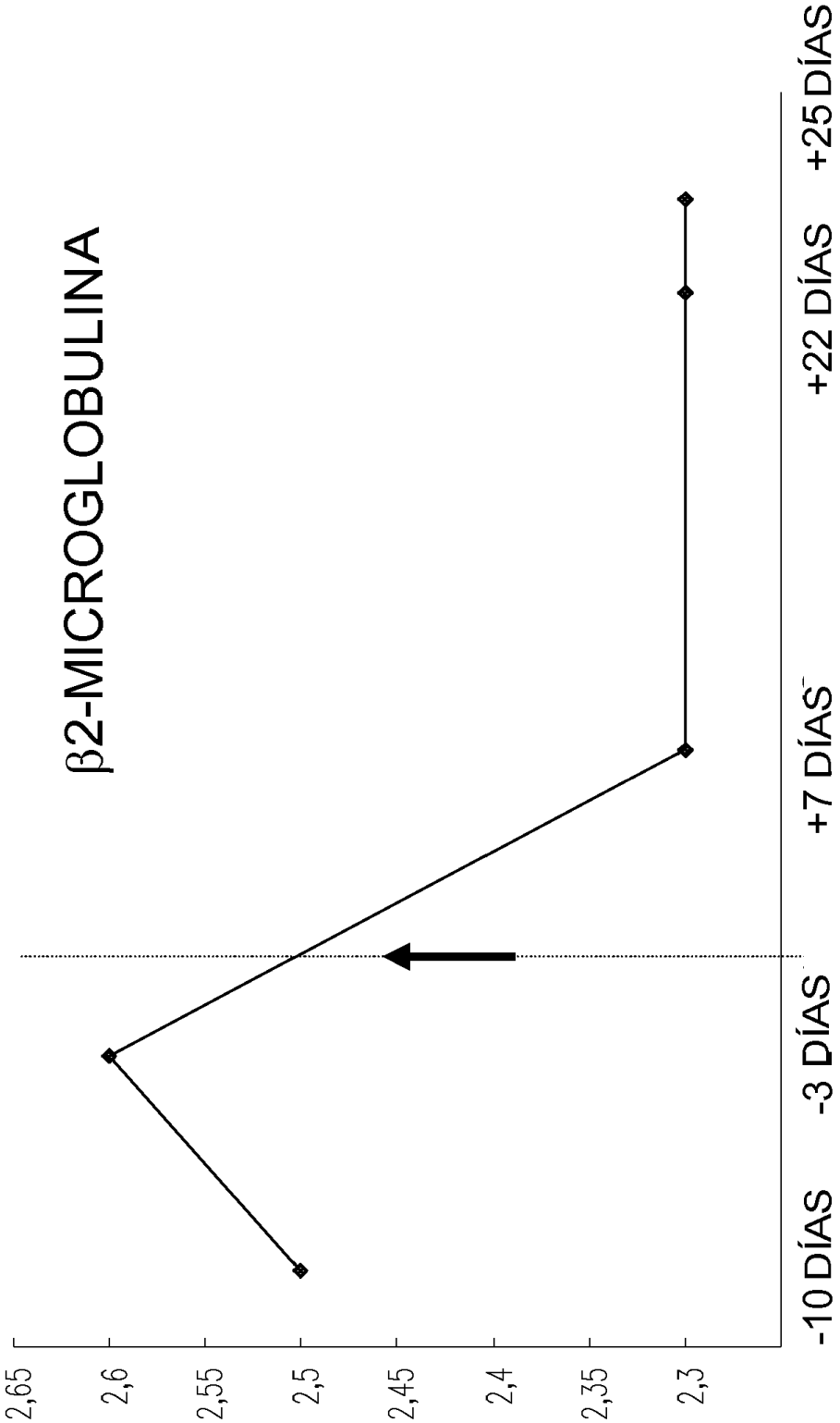

GOT
GPT
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
-7 DÍAS
+15 DÍAS
+38 DÍAS
+55 DÍAS
γ-GTP
80
70
60
50
40
30
-28 DÍAS
+7DÍAS
+12DÍAS
+22DÍAS

Fig.16


β2-MICROGLOBULINA
2,65
2,6
2,55
2,5
2,45
2,4
2,35
2,3
-10 DÍAS
-3 DÍAS
+7 DÍAS
+22 DÍAS
+25 DÍAS

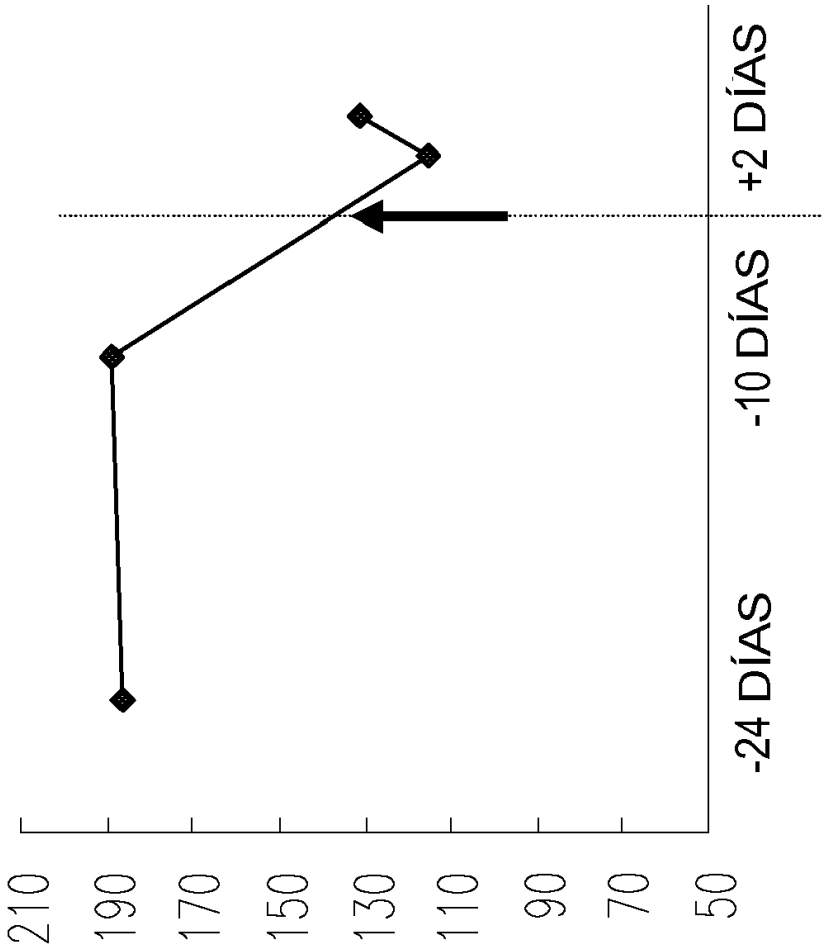


Fig.17

Fig.18

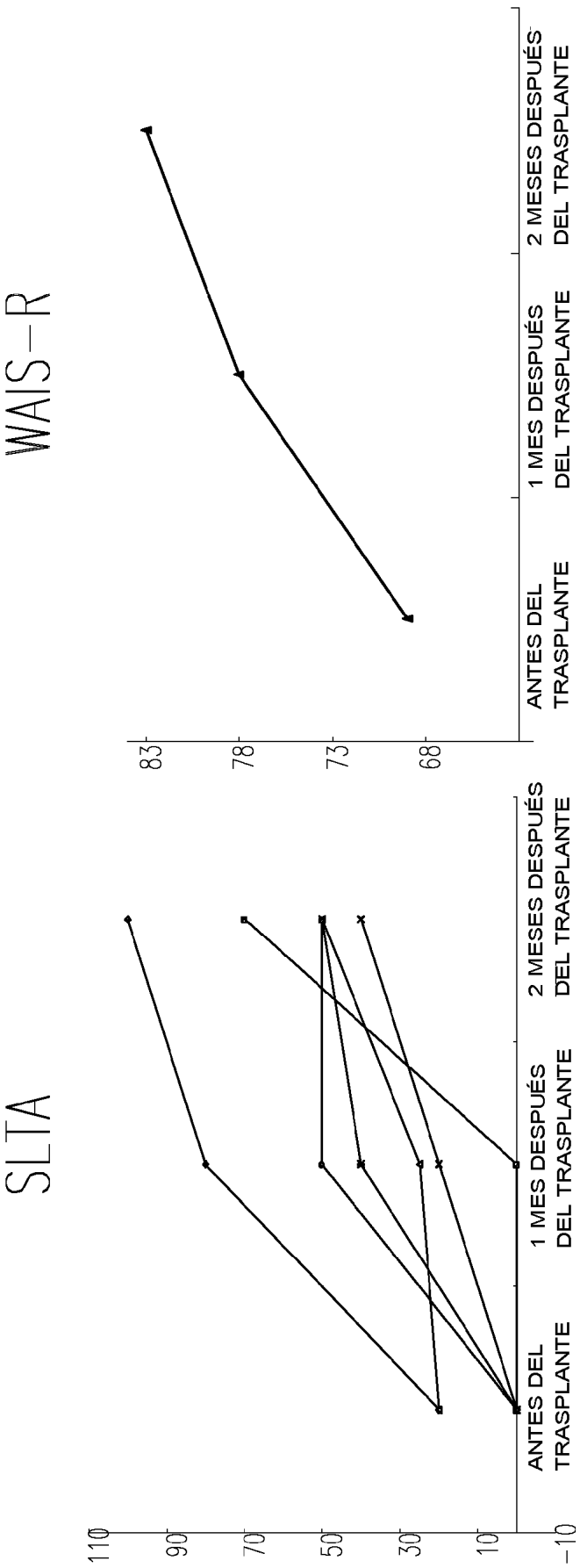
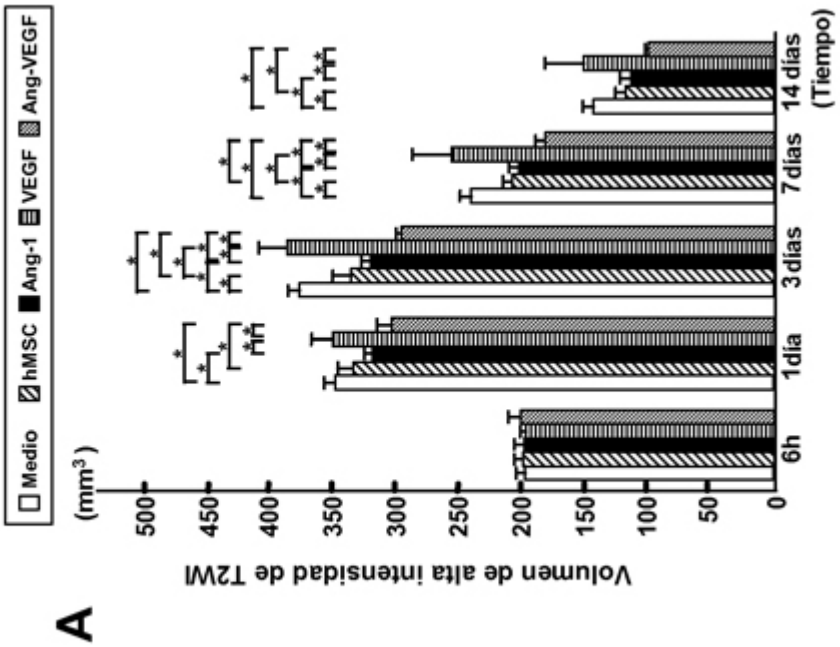

SLTA
110
90
70
50
30
10
−10
ANTES DEL TRASPLANTE
1 MES DESPUÉS DEL TRASPLANTE
2 MESES DESPUÉS DEL TRASPLANTE
WAIS−R
83
78
73
68
ANTES DEL TRASPLANTE
1 MES DESPUÉS DEL TRASPLANTE
2 MESES DESPUÉS DEL TRASPLANTE

Fig. 19


A
Medio
hMSC
Ang-1
VEGF
Ang-VEGF
Volumen de alta intensidad de T2WI
(mm3)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
6h
1dia
3dias
7dias
14 dias
(Tiempo)

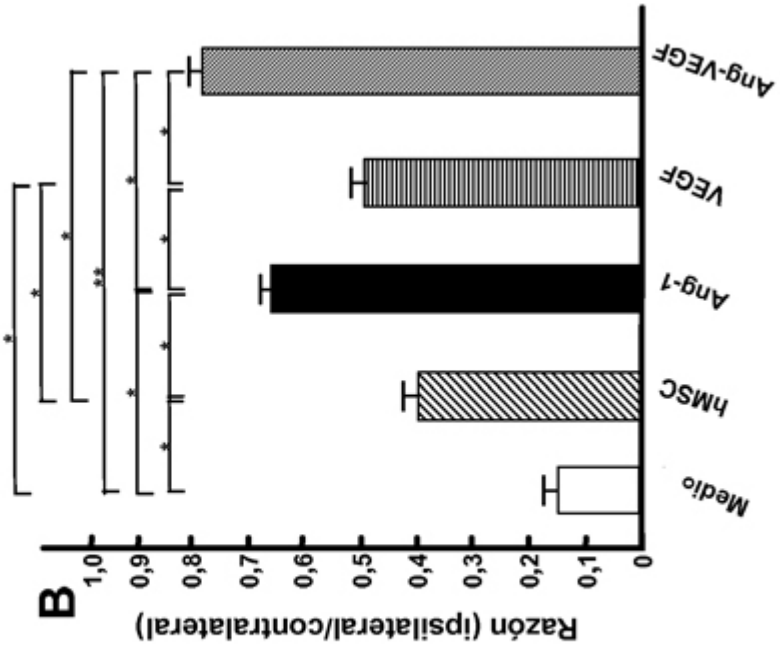
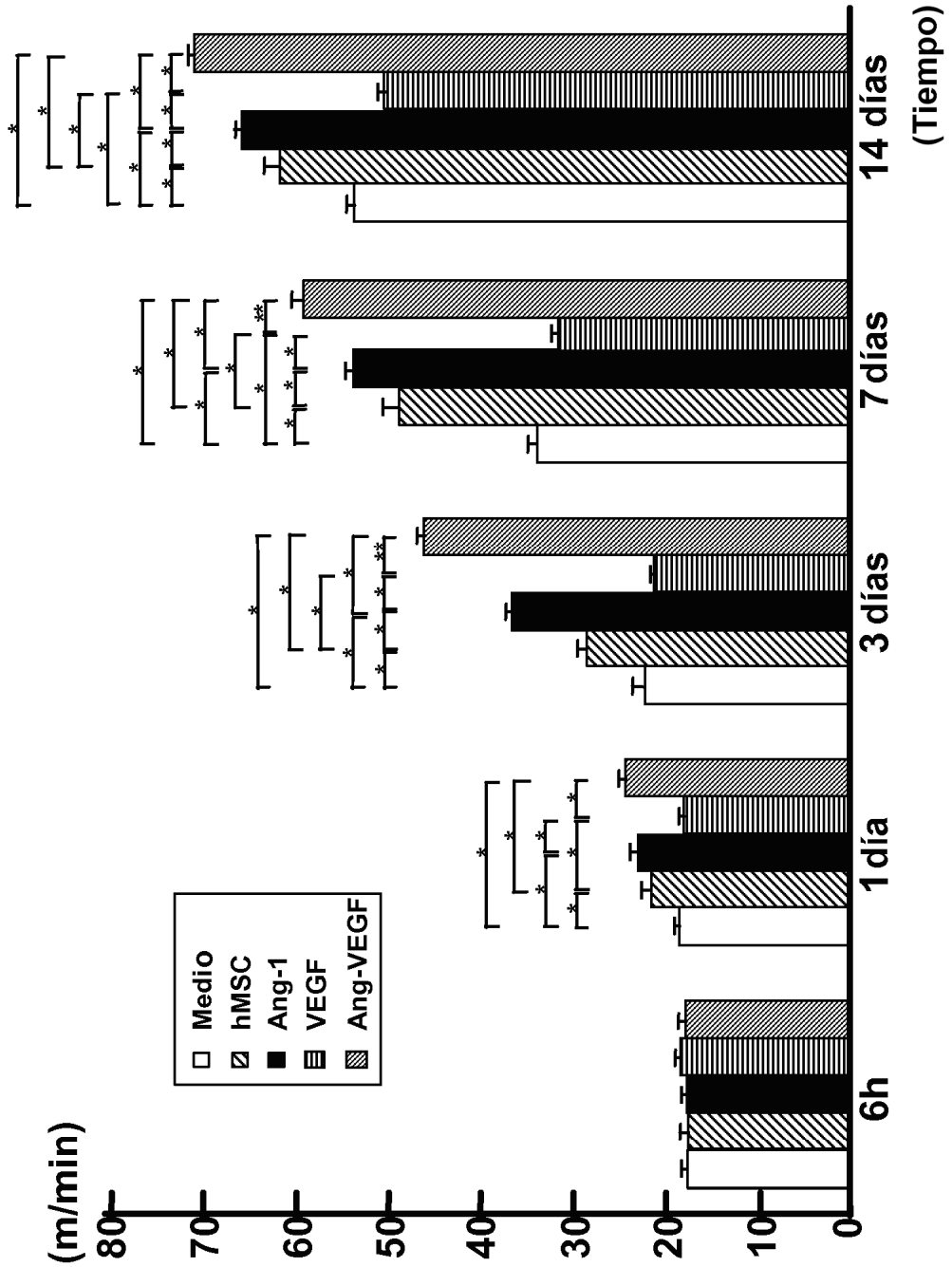

B
Razón (ipsilateral/contralateral)
1,0
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
Medio
hMSC
Ang-1
VEGF
Ang-VEGF

Fig. 20


(m/min)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Medio
hMSC
Ang-1
VEGF
Ang-VEGF
6h
1 día
3 días
7 días
14 días
(Tiempo)

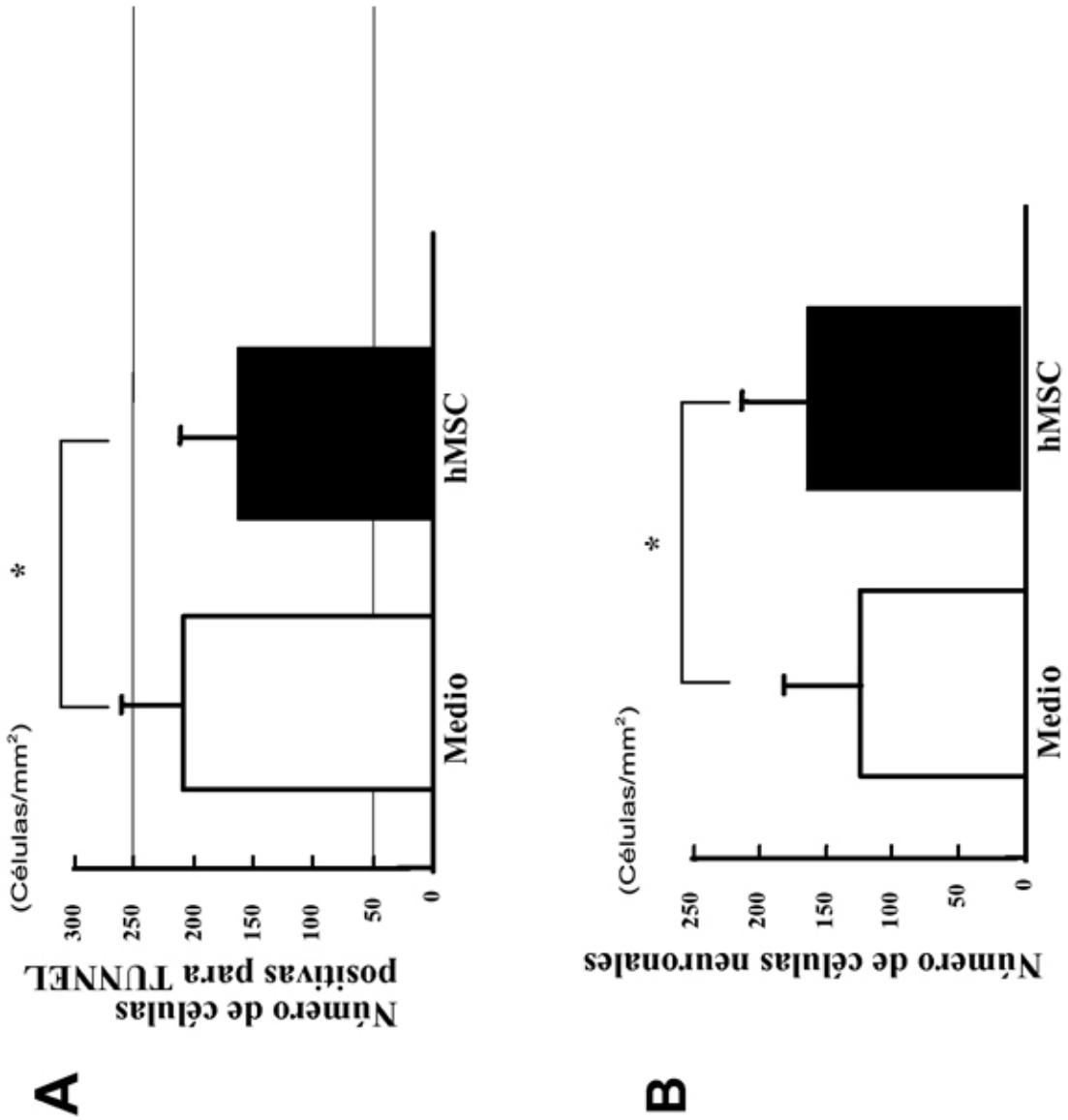

A
Número de células positivas para TUNEL
(Células/mm²)
300
250
200
150
100
50
0
*
Medio
hMSC
B
Número de células neuronales
(Células/mm²)
250
200
150
100
50
0
*
Medio
hMSC

Fig. 21

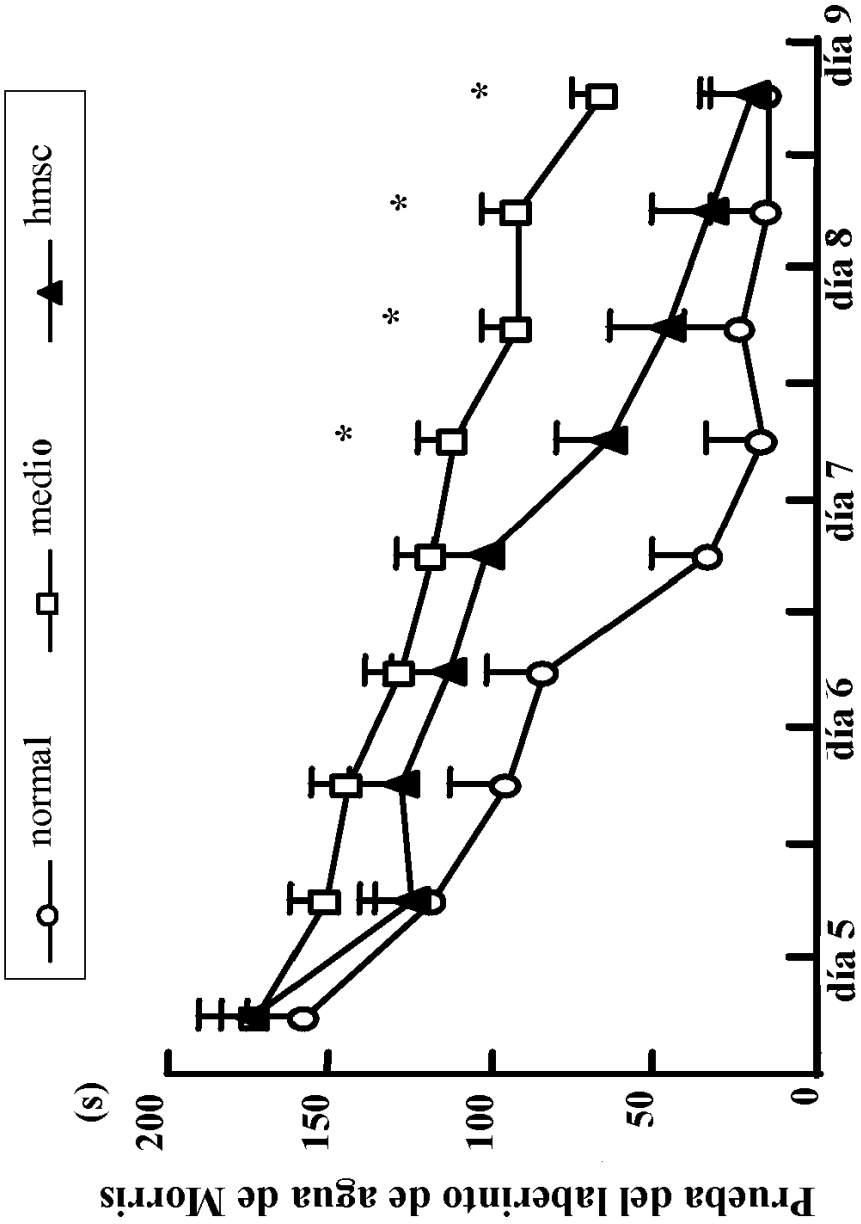

Prueba del laberinto de agua de Morris
(s)
200
150
100
50
0
día 5
día 6
día 7
día 8
día 9
normal
medio
hmsc
*
*
*
*

Fig. 22

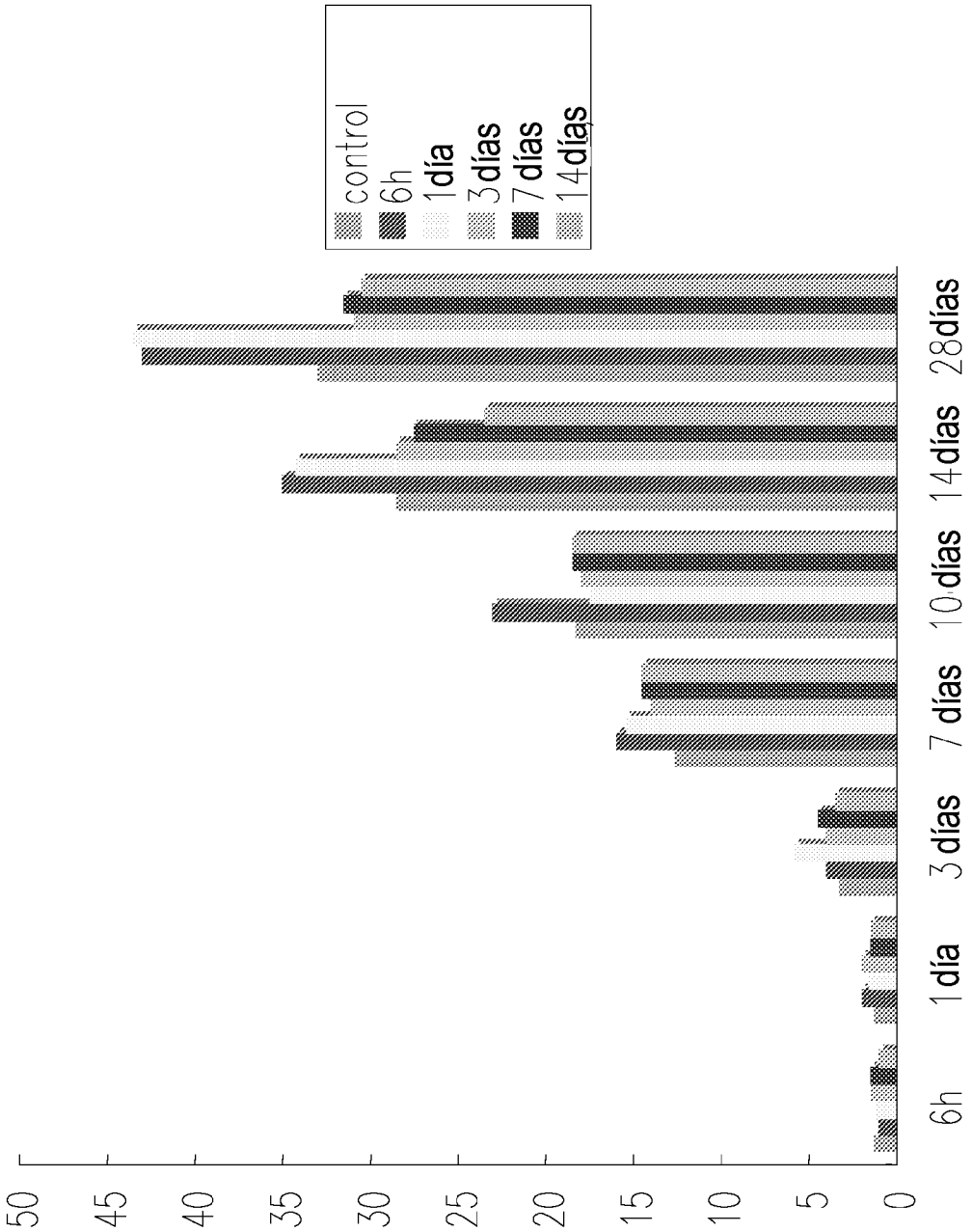

50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
6h
1 día
3 días
7 días
10 días
14 días
28 días
control
6h
1 día
3 días
7 días
14 días

Fig. 23