

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 617**

51 Int. Cl.:
C07K 14/475 (2006.01)
A61K 35/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03773862 .2**
- 96 Fecha de presentación: **14.11.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1563061**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **Cultivo de células inductoras de cabello**

30 Prioridad:
14.11.2002 US 426111 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.09.2012

73 Titular/es:
**ADERANS RESEARCH INSTITUTE, INC.
2211 NEWMARKET PARKWAY SUITE 142
MARIETTA, GA 30067, US**

72 Inventor/es:
**TEUMER, Jeffrey Keller;
QIAO, Jizeng;
PHILIPS, Erica y
WOLOWACZ, Richard Gregory**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 387 617 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

Cultivo de células inductoras de cabello

5 La presente invención se refiere al cultivo de células para usar en la inducción del cabello. En concreto, la invención se refiere a un procedimiento para cultivar células inductoras de cabello (por ejemplo células de la papila dérmica y/o células de la vaina dérmica.

10 La pérdida de cabello afecta a millones de personas, incluido más del 40 % de los varones mayores de 30 años de edad y un número significativo de mujeres. Muchas personas buscan remedios en diversos productos farmacéuticos y otros tratamientos, incluidos, por ejemplo, Minoxidil™ de liberación local (Pharmacia) y Propecia™(Merck) administrado por vía oral. Una solución a la pérdida de cabello es el trasplante de folículos pilosos, un procedimiento en el que cabellos de una región del cuero cabelludo que no ha perdido pelo se transplantan a regiones calvas. Los folículos de la región no calva conservan su baja susceptibilidad a los andrógenos incluso en su nueva localización. No obstante, este procedimiento está limitado por el número relativamente pequeño de folículos pilosos que se pueden recoger de la región no calva y “donar” a la región sin cabello. No se puede obtener un patrón completo de cabello con una densidad de folículos equivalente a la típica de, por ejemplo, los adolescentes, usando el trasplante de folículos pilosos.

20 Las células de la papila dérmica (células PD) se pueden extraer de los folículos pilosos (p. ej., derivados de zonas sin calvicie) y transplantar directamente en otro lugar de la piel en el que enseñará a la piel a formar nuevos folículos pilosos (Oliver, R.F., 1967, J. Embryol. Exp. Morphol. 18(1): 43-51). Este procedimiento se pudo desarrollar en una terapia alternativa para el restablecimiento de cabello. No obstante, un impedimento para el desarrollo de esta terapia alternativa ha sido que está sujeta a la misma limitación de la disponibilidad de folículos donantes.

25 Las células PD se pueden expandir en número cuando se cultivan usando condiciones convencionales, pero, en estas condiciones convencionales, pierden rápidamente su capacidad para inducir formación de cabello nuevo (Jahoda, C. & Oliver, R.F., 1981, Sr. J. Dermatol. 105(6): 623-7; Messenger, A.G., 1984, Sr. J. Dermatol. 110(6): 685-9). Por tanto, hay algo presente *in vivo* que preserve la capacidad de inducción de cabello que no está en el medio de cultivo celular convencional. Un procedimiento de trasplante de cabello que use trasplante de células PD no es comercialmente viable sin un procedimiento de cultivo que permita la expansión del número de células sin que pierdan la capacidad de inducción.

35 Recientemente se han descrito dos procedimientos que pueden soportar la expansión del número celular al tiempo que mantienen el potencial de inducción del cabello de las células PD. En un primer procedimiento se demostró que medio acondicionado nº PCT/US01/1 0164 publicada como documento WO 01/74164 y Ishimoto y col., 2002, Genes & Development 14: 1181-85). En este segundo procedimiento se añade al medio de cultivo una proteína *wnt* o un fragmento funcional o análogo del mismo como producto purificado o expresando una proteína recombinante en las células productoras y proporcionando la proteína *wnt* en medio acondicionado mediante el creamiento de células productoras *wnt* o mediante co-cultivo con las células productoras.

40 Un segundo procedimiento describe el cultivo de células de la papila dérmica en presencia de un mayor nivel de la proteína *wnt* o un agente que imita los efectos de la transducción de señal estimulada por *wnt* (véase la solicitud de patente internacional nº PCT/US01/1 0164 publicada como documento WO 01/74164 y Ishimoto y col., 2002, Genes & Development 14: 1181-85). En este segundo procedimiento se añade al medio de cultivo una proteína *wnt* o un fragmento funcional o análogo del mismo como producto purificado o expresando una proteína recombinante en las células productoras y proporcionando la proteína *wnt* en medio acondicionado mediante el creamiento de células productoras *wnt* o mediante co-cultivo con las células productoras.

50 Algunos problemas con los procedimientos conocidos son de una naturaleza práctica y están relacionados con aspectos reguladores, costes de fabricación y problemas técnicos. Para el primer procedimiento, normalmente un fabricante crioconservará un gran número de células para proporcionar un banco de células con propiedades idénticas que se puedan usar en la fabricación. Se tendrá que someter a las células de este banco a pruebas rigurosas de seguridad, incluidas pruebas que detecten agentes infecciosos que potencialmente podrían producir enfermedades en receptores humanos. En última instancia, el banco de células se vaciará y tendrá que volverse a llenar, y el nuevo banco requerirá nuevas pruebas. En el caso de una cepa celular derivada de un tejido primario, tal como queratinocitos de la piel que tienen un ciclo de vida limitada en cultivo, el tamaño del banco celular estará limitado por la capacidad de las células para crecer en cultivo, por lo que los costes asociados con el uso de dicha fuente tisular serán mayores de lo que serían si se dispusiera de la célula original en un suministro ilimitado. Además, puede haber variaciones entre los donantes de las cepas celulares originales que pueden dar lugar a condiciones de fabricación irreproducibles. El uso de una fuente celular alternativa, tal como las descritas en el presente documento, proporciona una fuente ilimitada de células con propiedades uniformes que sólo se tienen que analizar una vez.

65 En el segundo procedimiento descrito anteriormente, en el que se usa MC de una célula productora de *wnt* recombinante para estimular el crecimiento de las células PD se requerían, como mínimo, pruebas similares. No obstante, dado que las células están produciendo proteína recombinante se requieren pruebas de seguridad

adicionales. La estabilidad de la expresión del gen *wnt* en estas células productoras también es un posible problema y puede ser necesario volver a obtener o subclonar las células en el caso de que la expresión del gen *wnt* se pierda o reduzca en el tiempo en el cultivo.

- 5 La presente invención aborda los problemas asociadas con la técnica anterior permitiendo el cultivo de células inductoras de cabello usando una fuente celular alternativa con propiedades uniformes.

10 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de cultivo de células de la papila dérmica (PD) y/o células de la vaina dérmica (VD) de una especie de mamífero, en el que el procedimiento comprende las etapas de cultivar y subcultivar las células PD y/o las células VD en un medio de cultivo celular constituido por, o complementado con, un medio acondicionado mediante una o más células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos, de modo que las células PD y/o las células VS proliferan al tiempo que conservan su potencial inductor del cabello.

15 La capacidad de un medio acondicionado mediante células de acondicionamiento derivadas de tejido no epidérmico, tales como células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos, para mantener el fenotipo inductor de cabello de las células inductoras de cabello tales como las células de la papila dérmica (PD) y/o células de la vaina dérmica (VD) fue muy inesperada. En contraste con el documento USP 5,851,831, en el que los queratinocitos interaccionarían *in vivo* con las células epidérmicas para formar células pilosas, las células derivadas de tejido no
20 epidérmico usadas en la presente invención no necesariamente se asocian *in vivo* con las células inductoras de cabello. Por tanto, la presente invención muestra que varias células diferenciadas terminalmente o células progenitoras comprometidas que no son epidérmicas se pueden usar en lugar de queratinocitos para acondicionar el medio para conservar el potencial inductor de cabello de las células inductoras de cabello durante la fase de expansión del cultivo importante en cualquier proceso para producir un gran número de cabellos, por ejemplo a partir
25 de una biopsia pequeña que contiene relativamente pocos folículos.

El tejido puede ser de origen mesodérmico, es decir células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos. Un ejemplo de células de acondicionamiento de origen mesodérmico dentro del alcance de la invención son células epiteliales prostáticas, que se muestran en la sección experimental más adelante para ser particularmente eficaces
30 en el mantenimiento de la capacidad inductora de cabello de las células inductoras de cabello en cultivo. En otra realización, las células de acondicionamiento son fibroblastos dérmicos humanos. Es sorprendente que las células de origen mesodérmico que normalmente no se encuentran cerca de las células inductoras de cabello, tales como las células PD, al contrario que los queratinocitos usados en el documento USP 5,851,831 puedan, sin embargo, proporcionar señales similares a las células inductoras para conservar su potencial inductor.
35

El procedimiento se puede usar para el cultivo a largo plazo de células inductoras de cabello. El cultivo a largo plazo se puede definir mediante el número de pases o, más adecuadamente, mediante la duplicación de la población. En ocasiones, los fibroblastos primarios, queratinocitos y células satélite se pueden expandir hasta 120 duplicaciones de la población a partir de donantes jóvenes. Por ejemplo, cuando los fibroblastos se dividen de 1 a 3 durante el
40 pase, pueden llegar hasta el pase 40 antes de estar senescentes. No obstante, si la densidad de siembra usada fue menor, sufrirían más duplicaciones de la población entre cada pase. En términos absolutos, esto sería un cultivo a largo plazo. Se pueden obtener suficientes células inductoras de cabello (por ejemplo, células PD) para el trasplante de un patrón completo de cabello a partir de menos de 30 folículos por pase hasta el p3 (pase 3) usando una densidad de siembra óptima para las células. Por tanto, el procedimiento puede permitir el cultivo a largo plazo
45 de las células inductoras de cabello al tiempo que se mantiene la capacidad original (es decir, el potencial inductor de cabello) de las células intactas.

El medio de cultivo puede estar constituido esencialmente por el medio acondicionado. El medio de cultivo puede comprender células de acondicionamiento derivadas de tejido no epidérmico. Por tanto, el medio acondicionado se puede producir "*in situ*" mediante las células de acondicionamiento derivadas de tejido no epidérmico, ya que las células de acondicionamiento crecen en presencia de las células inductoras de cabello.
50

El medio acondicionado se puede obtener usando una línea celular (por ejemplo, una línea celular establecida). Es posible que estén más fácilmente disponibles las líneas celulares adecuadas o que sean más cómodas de cultivar en comparación con los procedimientos existentes de proliferación de las células inductoras de cabello. Por tanto, en
55 contraste con el medio de cultivo descrito en los documentos USP 5,851,831 y WO 01/74164, el medio de cultivo de la presente invención se puede preparar a partir de una línea celular estable que está disponible en un suministro prácticamente ilimitado. Como alternativa, el medio de cultivo se puede preparar a partir de una cepa celular derivada de tejido no epidérmico que está más fácilmente disponible o que sea más cómoda de cultivar.
60

La línea celular puede derivar de un donante que se ha sometido a detección y analizado para detectar factores de riesgo asociados con el trasplante.

El medio de cultivo puede carecer de genes recombinantes y/o de productos recombinantes de los mismos. El medio
65 de cultivo puede carecer de vectores virales. Los genes recombinantes y sus producto y vectores virales pueden plantear problemas de seguridad que se pueden evitar usando el presente procedimiento.

El medio acondicionado se puede congelar antes de usar.

Al subcultivar células inductoras de cabello, el medio de cultivo puede cambiarse completamente o se puede alimentar la división celular cambiando solo parte del medio, por ejemplo añadiendo medio acondicionado fresco.

5 El medio acondicionado se puede generar a partir de células cultivadas en medio sin suero. El posible problema de transmisión de agentes infecciosos potencialmente presentes en el suero ha llevado al uso de rebaños cerrados para generar suero en la fabricación de productos celulares. Estos agentes infecciosos incluyen las encefalopatías espongiiformes bovinas (EEB). Puede haber ventajas reguladoras significativas para un procedimiento que carezca
10 totalmente del uso de suero.

En una realización, las células de acondicionamiento se cultivan en un medio definido adecuado. Los expertos en la técnica conocerán los medios definidos, adecuados para la propagación y cultivo de cada tipo celular que se puede usar para la generación de medio acondicionado descrito en la presente invención.

15 El medio acondicionado puede tener un componente sin suero con un contenido en proteína total por encima de 10 µg/ml, por ejemplo por encima de 100 µg/ml o por encima de 1 mg/ml. En medio que contiene suero, normalmente el suero será el principal componente proteico.

20 El medio acondicionado puede estar concentrado (por ejemplo mediante ultrafiltración) antes de usar. Esto permitirá la concentración de factores necesarios para mantener el fenotipo inductor de cabello.

En otro aspecto de la invención, el procedimiento comprende además la etapa de subcultivar las células inductoras de cabello en el medio de cultivo para tres o más pases, por ejemplo siete o más pases. Por ejemplo, las células inductoras de cabello pueden ser sometidas a aproximadamente 30 duplicaciones de la población antes de usar.

25 El procedimiento puede comprender además la etapa de recolectar o aislar las células inductoras de cabello cultivadas o subcultivadas.

30 Las células inductoras de cabello pueden ser alogénicas del tejido no epidérmico. Como alternativa, las células inductoras de cabello pueden ser autólogas del tejido no epidérmico.

Las características descritas en relación con el primer aspecto de la presente invención también se refieren a otros aspectos de la invención descritos en el presente documento.

35 En otro aspecto se proporciona un procedimiento de proporcionar y mantener las células de la papila dérmica (PD) y/o la vaina dérmica (VD) para trasplante, en el que el procedimiento comprende las etapas de obtener una célula PD y/o VD de un sujeto y cultivar la célula PD y/o VD como se ha descrito anteriormente.

40 En otro aspecto de la invención se proporciona una composición que comprende células PD y/o VS y un medio de cultivo que comprende un medio acondicionado por células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos.

El medio acondicionado, es decir el medio acondicionado por células derivadas de tejido no epidérmico, se puede definir como el medio gastado obtenido mediante el crecimiento de células vivas en medio de cultivo. El medio acondicionado contiene numerosos factores secretados expresados y secretados al medio de cultivo por las células vivas cultivadas. Estos factores secretados incluirían numerosas moléculas y macromoléculas (proteínas, glicoproteínas, tales como factores de crecimiento, proteasas, receptores solubles, hormonas etc.), así como productos de deshecho producidos por las células de acondicionamiento. Diferentes linajes de células expresan diferentes fenotipos y, por tanto, secretarán al medio de cultivo diferentes conjuntos de factores y/o factores a diferentes concentraciones. Por tanto, un medio acondicionado a partir de un cultivo de fibroblastos contendrá, por ejemplo, diferentes moléculas a concentraciones diferentes con respecto a un medio acondicionado de un cultivo de queratinocitos.

Normalmente, las células vivas pueden crecer en un cultivo monocapa en diversos contenedores, incluida la superficie de matraces de cultivo tisular estándar (p. ej., T175 o T75), frascos giratorios o en perlas microtransportadoras. El medio acondicionado puede incluir uno o más medios basales conocidos (p. ej., DMEM, de CHanh, Hams F12 etc.). El medio acondicionado también puede derivar de cultivos celulares tridimensionales de un tejido u órgano. El medio acondicionado puede derivar del cultivo en medio sin suero o suplementado con suero. Los expertos en la técnica pueden desarrollar empíricamente la optimización de la longitud de tiempo de cultivo requerida para que las células secreten factores a una concentración suficiente y/o el volumen del medio de cultivo que se va a usar para un número dado de células. En términos generales, cuanto mayor es el número de células para un volumen dado y mayor sea el tiempo durante el cual las células se cultivan para producir un medio acondicionado, mayor es la concentración de "factores secretados" típicos de un linaje celular.

65 El medio acondicionado se puede analizar para determinar su actividad de acuerdo con la invención como se describe en la sección experimental más adelante. Puede ser deseable adoptar un enfoque de garantía de calidad

para definir estrechamente todos los procedimientos para garantizar la consistencia de la fabricación de un medio acondicionado. Por ejemplo, la densidad de la siembra celular, los regímenes de alimentación, el volumen del medio de cultivo, el medio basal y/o los suplementos podrían definirse y aplicarse con precisión.

5 En una realización de la invención, el cultivo de células inductoras de cabello, es decir el “producto” derivado, es autólogo, Las células inductoras de cabello, tales como las células PD y/o VD se obtienen de una biopsia. Las células no epidérmicas específicas derivan de otra biopsia y se cultivan para proporcionar el medio acondicionado. Este medio acondicionado se añade a las células PD y/o VD para permitirles conservar el potencial inductor. Normalmente, las células PD y/o VD se pueden obtener de una biopsia de piel de 1-2 cm² que contiene, de media,
10 400 folículos y se expande (por ejemplo hasta el pase 3) para obtener suficientes células para el trasplante de células PD y/o VD por parte de un cirujano de cabello o de otro modo.

En otra realización de la invención, solo el componente celular PD y/o VS es autólogo. Las células PD y/o VS se obtienen como se ha indicado anteriormente a partir de una biopsia. No obstante, las células no epidérmicas a partir de las cuales se obtiene el medio acondicionado se obtienen de una fuente distinta (preferentemente una fuente alogénica o xenogénica). Esta fuente procedería, preferentemente, de un banco celular validado que se ha sometido a detección selectiva de agentes extraños. Dado que estas células se almacenan como bancos celulares maestros, puede ser posible fabricar grandes cantidades de medio acondicionado usando procedimientos de cultivo tisular conocidos. En este caso, el medio acondicionado podría concentrarse mediante procedimientos proteicos estándar, por ejemplo ultrafiltración, y almacenarse como una reserva concentrada, a añadir a las células PD y/o VD como suplemento, según sea adecuado. Este enfoque tiene ciertas ventajas en cuanto a que si se prepara un lote grande de medio acondicionado, se puede analizar una muestra pequeña por su capacidad para permitir que las células PD y/o VD conserven su potencial inductor en un ensayo de inducción de cabello. Dado que los ensayos de inducción de cabello requieren tiempo, puede haber ventajas adicionales en cuanto a la fiabilidad del uso de células PD y/o VD expandidas con respecto al uso de un aditivo del lote con una actividad de control de calidad (CC) analizado. Esto contrasta con el procedimiento del documento USP 5,851,831 en el que el medio acondicionado de queratinocitos se puede usar sin saber por una prueba de CC si se ha conservado la actividad que causa la retención de la capacidad inductora de cabello de las células PD y/o VD.
15
20
25

30 En una realización adicional de la invención, las células PD y/o VD que se van a expandir pueden obtenerse de una fuente alogénica. Esto se puede usar junto con medio acondicionado derivado de una fuente alogénica como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, las células PD y/o VD procederían de una fuente celular sometida a detección selectiva de la presencia de agentes extraños y de una fuente aprobada por agencias reguladoras adecuadas.

35 Por tanto, la invención aborda el bloque previo al desarrollo de un procedimiento rentable reproducible para la comercialización del trasplante de células inductoras de cabello (por ejemplo, células PD y/o VD).

40 A continuación se describirán realizaciones específicas de la invención con referencia a las figuras adjuntas de las cuales:

Fig. 1 es una fotografía que muestra las células de la papila dérmica justo después del aislamiento;

45 La Fig. 2 es una fotografía que muestra las células de la papila dérmica cultivadas en MC de queratinocitos.

La Fig. 3 es una fotografía que muestra las células de la papila dérmica cultivadas en MC recogido de células epiteliales prostáticas humanas.

50 La Fig. 4 es una fotografía que muestra un injerto generado usando el ensayo de reconstitución de piel en el que las células dérmicas injertadas eran fibroblastos dérmicos humanos que no se espera que induzca crecimiento de cabello;

55 La Fig. 5 es una fotografía que muestra un injerto generado usando el ensayo de reconstitución de piel en el que las células de la papila dérmicas injertadas se cultivaron en MC para queratinocitos; y

La Fig. 6 es una fotografía que muestra un injerto generado usando el ensayo de reconstitución de piel en el que las células de la papila dérmicas injertadas se cultivaron en MC para células epiteliales prostáticas.

Parte experimental

60 Los experimentos descritos más adelante demuestran el cultivo de células PD en diferentes medios para mostrar que el crecimiento en medio acondicionado (MC) de la presente invención tiene como resultado el mantenimiento de la capacidad de inducción de cabello y la morfología asociada con la capacidad de inducción de cabello.

65

Materiales y procedimientos

Preparación de medio acondicionado (MC)

5 Cuando las células cultivadas para MC de ensayo alcanzaron un estado cerca de la confluencia se aplicó medio fresco. Tras 5 días, se extrajo el medio y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm para eliminar las células y los residuos. El MC se combinó con medio fresco a una proporción de 1:1 (volumen:volumen) y se usó para alimentar las células de la papila dérmica cultivadas. El MC se generó a partir de queratinocitos humanos cultivados en condiciones estándar.

10

Líneas celulares

Se analizaron los siguientes tipos celulares: 2 líneas celulares de tumor de mama humano; MCF-7 (Colección Americana de Cultivos Tipo; ATCC) y MDA-MB-231 (ATCC); y la línea celular de carcinoma embrionario, N-tera-2 (P. Andrews, Sheffield, Reino Unido, células epiteliales mamíferas humanas (Cascade Biologics, Oregon, EE.UU.), y melanocitos humanos (Cambrex, New Jersey, EE.UU.). Se analizaron los siguientes tipos celulares de origen mesodérmico: Fibroblastos dérmicos humanos (HDF, que se aislaron de tejido humano escindido recientemente y cultivadas en condiciones estándar), mioblastos de músculo esquelético (Cambrex), células epiteliales prostáticas (Cambrex). Otros tipos celulares disponibles para su análisis son: células epiteliales renales, células endoteliales y células del sistema inmunitario (de origen mesodérmico); y hepatocitos y epitelio de la vejiga urinaria (de origen endodérmico), A menos que se indique lo contrario, los tipos celulares se cultivaron en las condiciones recomendadas por los proveedores.

Cultivo de células PD humanas

25 PD humana se introdujo en cultivo tras microdissección de la PD de los folículos pilosos. Tras 5 días en medio estándar, los medios se sustituyeron con MC de ensayo. El medio de cultivo se sustituyó cada 2-3 días y los cultivos se pasaron cuando llegaron a la confluencia. Los cultivos se mantuvieron de este modo durante varios pases. Las células mostradas en las Figuras 2 y 3 se fotografiaron en el pase 3.

30

Ensayo para inducción de cabello

El ensayo de reconstitución de piel (Lichti, y col., 1993, J Invest. Dermatol. 101: 124S-129S; y Weinberg y col., 1993, J Invest. Dermatol. 100: 229-236) se usó para analizar la inducción de cabello por las células inductoras de cabello cultivadas (por ejemplo, PD). Se realizaron heridas circulares de espesor completo sobre el dorso de ratones atímicos y se colocó una cámara de injerto en las heridas. En las cámaras de injerto se inyectaron queratinocitos de roedor mezclados con células cultivadas de la papila dérmica o fibroblastos dérmicos (como control negativo). Después de una semana se retiraron las cámaras y se vendaron las heridas. Las células injertadas formaron piel de espesor completo y, su hay células de la papila dérmica inductoras de cabello, también se formaron nuevos folículos de cabello. Los nuevos cabellos inducidos por las células PD aparecieron en un plazo de semanas desde el injerto.

40

Resultados y discusión

45 Las células de la papila dérmica tienen una morfología característica cuando se aíslan por primera vez. Las células son pequeñas y redondas o poligonales y crecen en racimos sueltos (Figura 1). En algunos cultivos precoces también hay células planas grandes que no se dividen. Con el tiempo de cultivo en medio estándar la proporción de células planas grandes aumenta. Estas células tienen una capacidad menor de inducir la formación de folículos pilosos. Por tanto, la morfología observada en condiciones de cultivo ideales se puede ver como primera indicación de la capacidad de inducción de cabello.

50

55 Cuando las células PD se cultivan usando MC derivado de queratinocitos (como se describe en el documento USP 5,851 ,831), la morfología característica se mantiene en numerosos pases. La Figura 2 muestra un cultivo de células PD cultivadas hasta el pase 7 en MC de queratinocitos. En este medio, las células conservan su morfología además de su capacidad para inducir la formación de cabello.

60

Las PD cultivadas en MC recogidas de células epiteliales prostáticas humanas se muestran en la Figura 3. Estas células tienen una morfología similar a las células cultivadas en MC de queratinocitos, lo que sugiere que el medio acondicionado con epitelio prostático humano puede mantener la capacidad de las células PD para inducir formación de cabello.

60

65 En otros experimentos, las células PD humanas o las células control negativo se cultivaron en presencia de varios medios acondicionados o control, como se ha descrito anteriormente. Tras 21 días de cultivo, se analizaron las células para determinar la inducción de cabello en el ensayo de reconstitución de piel. Cuando tiene lugar la inducción de cabello se pueden ver nuevos cabellos que crecen a partir de los injertos, normalmente en un plazo de 4 semanas desde el injerto.

Las Figuras 4 a 6 son fotografías que muestran los resultados del ensayo de reconstitución de piel. La Fig. 4 muestra los resultados de un experimento con control negativo en el que se implantaron fibroblastos dérmicos humanos cultivados en medio estándar y fracasaron en la inducción de formación de cabello. La Fig. 5 muestra un experimento con control positivo en el que se implantaron células PD cultivadas en MC derivado de queratinocitos (como se describe en el documento USP 5,851,831) e indujeron la formación de cabello. Como se puede ver en la Fig. 6, las células PD cultivadas en MC derivado de células epiteliales prostáticas indujeron formación de cabello en cantidades similares a la cantidad de cabello inducido por las células PD cultivadas en MC de queratinocitos (Fig. 5). Por tanto, como los queratinocitos, las células epiteliales prostáticas acondicionan el medio de un modo tal que hacen que el medio sea capaz de mantener el potencial inductor de cabello de las células PD.

La Tabla 1 enumera los resultados del ensayo de reconstitución de piel. De los cultivos analizados, las células PD cultivadas en MC de células epiteliales prostáticas dieron la inducción de cabello más fuerte. Las PD cultivadas en MC de fibroblastos dérmicos humanos (HDF) mostraron una modesta inducción de cabello. El MC de mioblastos de músculo esquelético no pareció soportar la inducción de cabello. Los cultivos de PD cultivadas en MC de melanocitos o MC de N-Tera-2 no indujeron crecimiento de cabello. Asimismo, las células de PD cultivadas en MC de los demás ejemplos de tipos celulares derivados de ectodermo, es decir el epitelio de mama (incluidas dos líneas celulares de tumor de mama) no indujeron crecimiento de cabello.

Tabla 1

Fuente de células en MC	Nº de injertos con cabello/nº de injertos	Origen de la línea germinal
Melanocitos	0/3	Ectodermo
MCF-7 (carcinoma de mama)	0/2	Ectodermo
MDA-MB-231 (carcinoma de mama)	0/3	Ectodermo
Epitelio de mama	0/3	Ectodermo
N-tera-2	0/4	Ectodermo
Fibroblasto dérmico humano	1/3	Mesodermo
Mioblastos de músculo esquelético	0/4	Mesodermo
Epitelio prostático	3/3	Mesodermo

La interacción entre queratinocitos, un tipo de célula epitelial, y las células PD, un tipo de célula mesenquimatosa, es similar a las interacciones mesénquima-epitelio en el cuerpo. Las interacciones mesénquima-epitelio son procesos fundamentales que se producen durante la embriogénesis y contribuyen a la formación de muchos órganos y otras estructuras en el cuerpo. Estas interacciones están mediadas por moléculas de señalización producidas por un tipo celular que instruyen al otro tipo celular a responder de un modo característico. La presente invención demuestra que, sorprendentemente, los queratinocitos pueden sustituirse con otro tipo celular que produce la misma molécula de señalización o una similar con el fin de obtener la respuesta en una célula mesenquimatosa. Estos otros tipos celulares, como se describen en el presente documento, son, por tanto, capaces de mantener las células inductoras de cabello en un estado de inducción de cabello en cultivo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cultivo de células de la papila dérmica (PD) y/o células de la vaina dérmica (VD) de una especie de mamífero, en el que el procedimiento comprende las etapas de cultivar y subcultivar las células PD y/o las células VD en un medio de cultivo celular constituido por, o complementado con, un medio acondicionado mediante una o más células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos, de modo que las células PD y/o las células VS proliferan al tiempo que conservan su potencial inductor del cabello.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio acondicionado por una o más células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos se obtiene usando una línea celular (por ejemplo, una línea celular establecida).
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el medio de cultivo carece de vectores virales.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio acondicionado por una o más células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos se congela antes de usar.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio acondicionado por una o más células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos se genera a partir de células cultivadas en medio sin suero.
6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medio acondicionado por una o más células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos se concentra (por ejemplo mediante ultrafiltración) antes de usar.
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende la etapa de subcultivar las células PD y/o VD en el medio acondicionado por una o más células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos para tres o más pases, por ejemplo siete o más pases.
8. El procedimiento acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende la etapa de recolectar o aislar células PD y/o células VD cultivadas o subcultivadas.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células PD y/o células VD son alogénicas con respecto a las células epiteliales prostáticas o a los fibroblastos dérmicos humanos.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células PD y/o células VD son autólogas con respecto a las células epiteliales prostáticas o a los fibroblastos dérmicos humanos.
11. Un procedimiento de proporcionar y mantener las células de la papila dérmica (PD) y/o las células de la vaina dérmica (VD) para trasplante, en el que el procedimiento comprende las etapas de cultivar una célula PD y/o VD obtenida de un sujeto en las condiciones descritas en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
12. Una composición que comprende células PD y/o VS y un medio de cultivo que comprende un medio acondicionado por células epiteliales prostáticas o fibroblastos dérmicos humanos.



Fig. 1

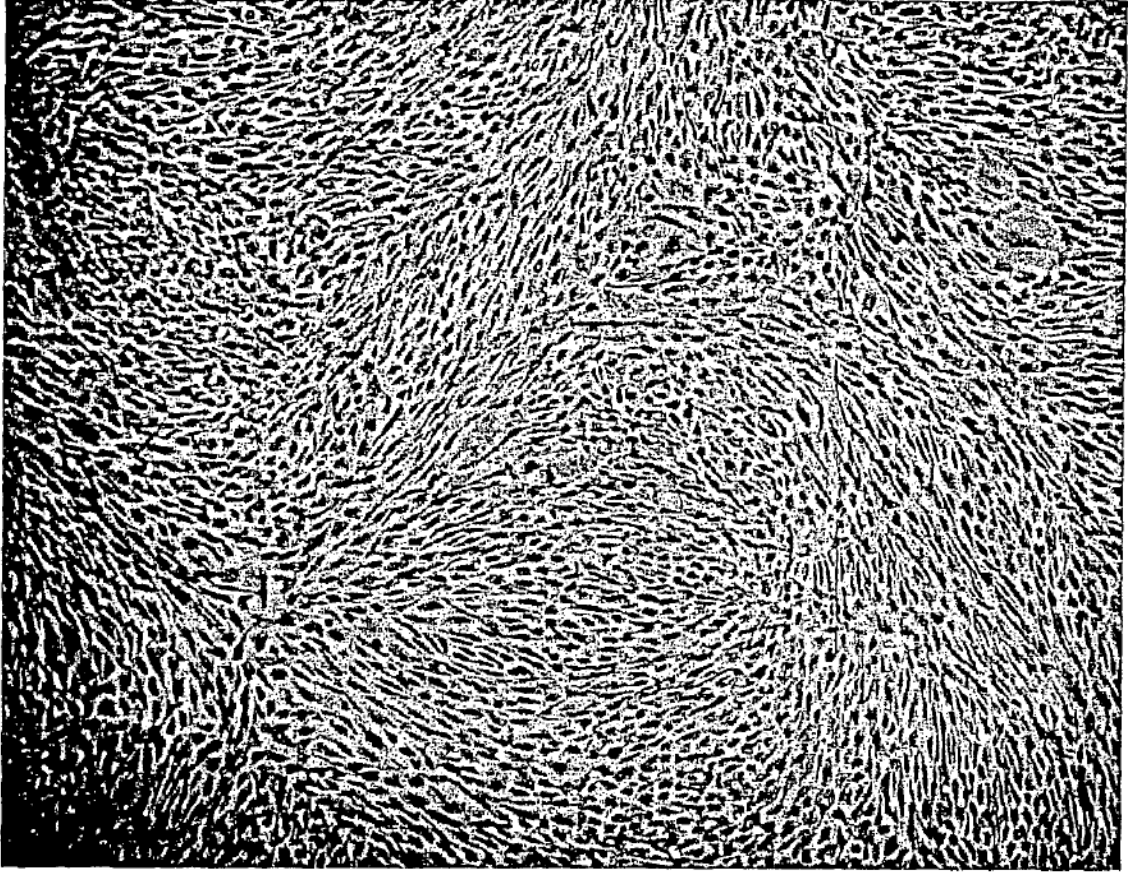


Fig. 2

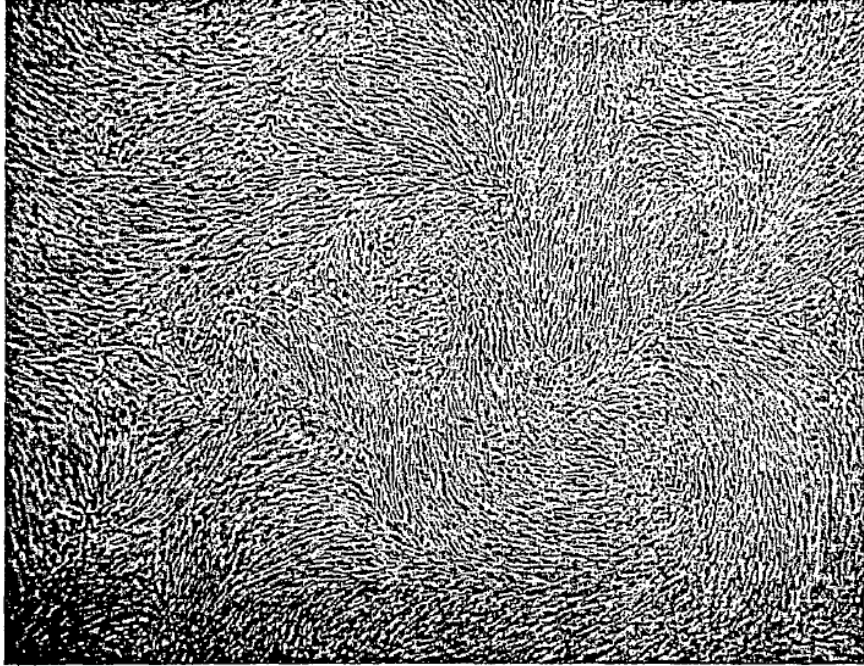


Fig. 3

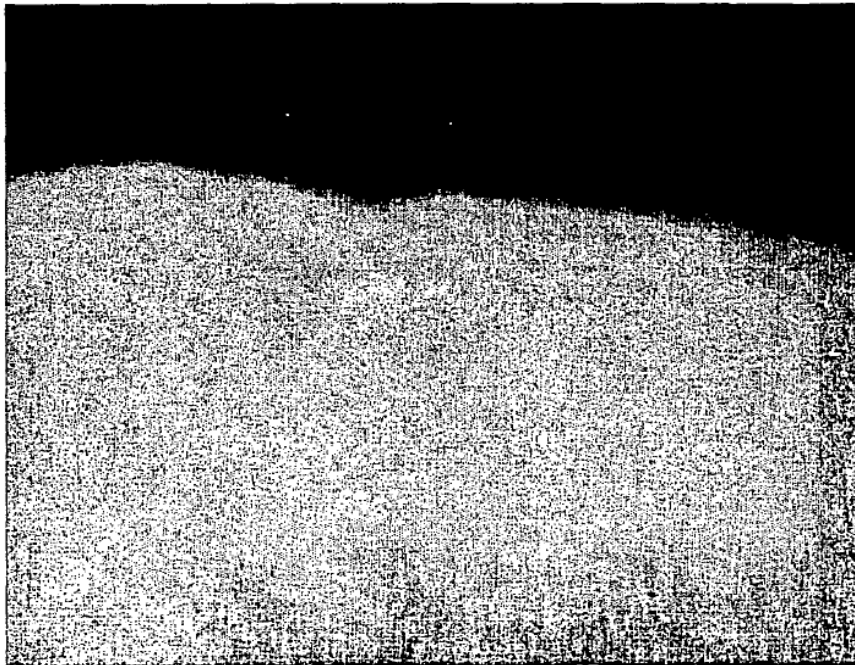


Fig. 4

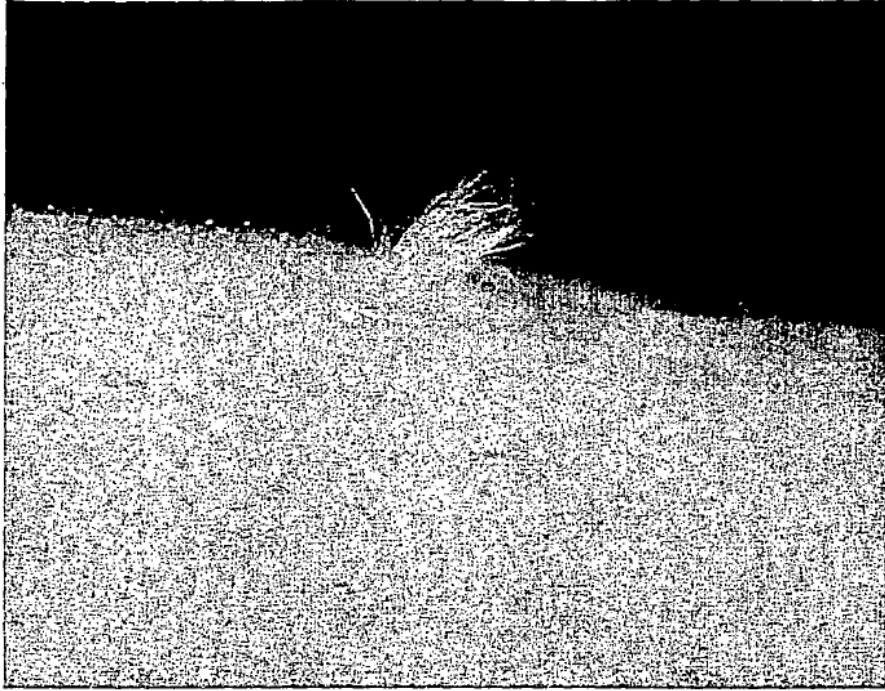


Fig. 5

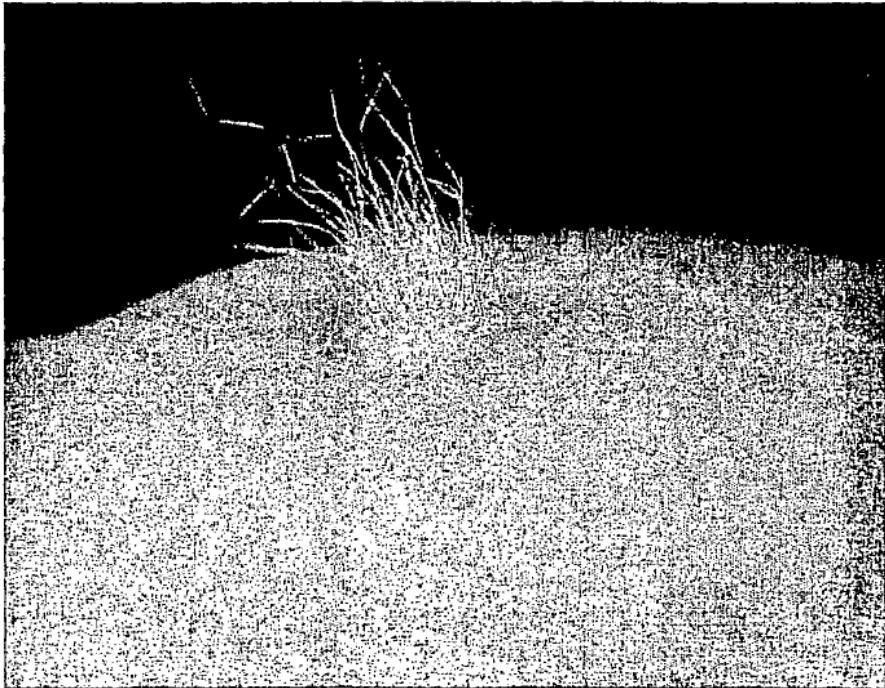


Fig. 6