

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 528**

51 Int. Cl.:

C12N 5/077 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

A61L 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2007** **E 12155498 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017** **EP 2455111**

54 Título: **Masa celular capaz de servir como estructura de tipo órgano primitivo compuesta por una diversidad de tipos de células de origen somático**

30 Prioridad:

27.06.2006 JP 2006176763

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

10.11.2017

73 Titular/es:

SHISEIDO COMPANY, LIMITED (100.0%)
5-5, Ginza 7-chome Chuo-ku
Tokyo 104-8010, JP

72 Inventor/es:

FUJIWARA, SHIGEYOSHI;
KISHIMOTO, JIRO y
SOMA, TSUTOMU

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 641 528 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

Masa celular capaz de servir como estructura de tipo órgano primitivo compuesta por una diversidad de tipos de células de origen somático

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un método para producir una masa celular capaz de servir como estructura de tipo órgano primitivo compuesta por diversos tipos de células de origen somático.

Técnica anterior

- 10 Gracias a los notables avances que se han hecho en el campo de la medicina en los últimos años, las oportunidades de salvar vidas han seguido aumentando eliminando las causas de las enfermedades mediante, por ejemplo, las técnicas terapéuticas sistemáticas en forma de la extirpación quirúrgica del cáncer o las técnicas de trasplante de donantes vivos para tejidos y órganos. Sin embargo, hay casos en los que los pacientes sufren una considerable disminución en la QOL (del inglés "Quality Of Life": calidad de vida) que acompaña a la escisión de un área afectada. Además, existen limitaciones en el tratamiento dependientes de trasplantes de donantes vivos debido a factores tales como la escasez de donantes para trasplante y la aparición de rechazo. Si fuera posible regenerar un tejido o un órgano que se ha perdido debido a un tratamiento quirúrgico o a un accidente imprevisto, entonces sería posible mejorar considerablemente la calidad de vida de los pacientes. Además, la medicina regenerativa hace posible también resolver los problemas que afrontan los trasplantes de donantes vivos. Desde este punto de vista, el grado de las expectativas puestas en la medicina regenerativa es elevado.

- 20 Las tecnologías en las que la medicina regenerativa ha obtenido éxito están relacionadas principalmente con tejido comparativamente simple en términos de morfología o función a la manera de la piel artificial, hueso artificial y dientes artificiales. La piel artificial y el hueso artificial reconstruidos se incorporan en células que permiten que se proporcionen las señales requeridas para la construcción de tejidos. Sin embargo, ha habido limitaciones en el repertorio de la diferenciación de la piel artificial y hueso artificial por técnicas de medicina regenerativa. Por ejemplo, aunque los queratinocitos alogénicos o fibroblastos de la piel y similares se diferencian en estructuras en forma de epidermis, son incorporados por los órganos circundantes para tener finalmente una capa córnea o capa basal que tiene propiedades de barrera, se ha publicado que no hay derivación de derivados secundarios tales como folículos pilosos, glándulas sebáceas o glándulas sudoríparas.

- 30 El tejido corporal contiene normalmente tanto células que son capaces de auto-replicarse y tienen propiedades de células madre para mantener la homeostasis del tejido enviando señales a las células diferenciadas o suministrando células diferenciadas, como células que tienen propiedades de células somáticas que ya se han diferenciado que reciben diversas señales u órdenes a partir de tales células, y es capaz de funcionar a través de la interacción entre ambos tipos de células. En el caso de los vertebrados, por ejemplo, la interacción entre las células mesenquimales y las células epiteliales es esencial para la formación de casi todos los tejidos y órganos. En el caso de los folículos pilosos, las células mesenquimales en forma de células de la papila capilar son responsables de las propiedades similares a las de las células madre, mientras que las células epiteliales en forma de queratinocitos son equivalentes a las células que tienen propiedades similares a las de las células somáticas en el sentido de que se diferencian en tallos pilosos (el propio pelo).

- 40 La dificultad que se encuentra cuando se forman órganos mediante la medicina regenerativa estriba en alcanzar un estado de coexistencia entre las células que tienen propiedades similares a las de las células madre mantenidas en un estado no diferenciado y las células que ya se han diferenciado como en el tejido corporal real. En la técnica anterior, incluso si las células epiteliales y las células mesenquimales pudieron ser cultivadas en común, o terminaron la diferenciación o bien ambas mantuvieron un estado no diferenciado, evitando de esta manera la reproducción de la coexistencia de células no diferenciadas y células diferenciadas para imitar tejido corporal real.

Descripción de la invención

- 45 Un objeto de la presente invención es proporcionar una masa celular capaz de servir como estructura de tipo órgano primitivo combinando y cultivando una diversidad de tipos de células somáticas diferenciadas.

La presente solicitud incluye las siguientes invenciones:

- 50 (1) un método para producir una masa celular capaz de servir como estructura de tipo de órgano primitivo compuesta de combinaciones de células de la vaina externa de la raíz (ORS; del inglés "Outer Root Sheat") y células de la papila capilar, que comprende:

preparar cultivos que contienen las células de la vaina externa de la raíz (ORS) y células de la papila capilar;

mezclar los cultivos de células de la vaina externa de la raíz (ORS) y de células de la papila capilar seguido de adición de un activador de la señal de Wnt al cultivo mixto de células;

someter el cultivo que contiene el activador de la señal de Wnt al cultivo mediante un método de la gota colgante o un método de formación de esferoides durante un período de tiempo predeterminado; y

reemplazar el medio del cultivo cultivado por un método de la gota colgante o un método de formación de esferoides con medio que no contiene activador de la señal de Wnt y seguir cultivando durante un periodo de tiempo predeterminado; en el que,

al menos un tipo de las células de la vaina externa de la raíz (OSR) y células de papila capilar se mantiene en un estado no diferenciado;

(2) el método de (1), en el que el activador de la señal de Wnt es 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO);

(3) el método del apartado (1), en el que los folículos pilosos que tienen una función inductora de folículo piloso se forman a partir de la masa celular;

(4) el método del apartado (1), en el que el activador de la señal de Wnt se selecciona del compuesto bis-indolo (indirrubina), ((2'Z,3'E)-6-bromoindirrubin-3'-oxima), (2'Z,3'E)-6-bromoindirrubin-3'-acetoxima), 4-bencil-2-etil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona 2,4-dibencil-5-oxotiazolidin-3-tiona, 2-cloro-1-(4,4-dibromo-tiofen-2-il)-etanona, [alfa]-4-dibromoacetofenona, N-(4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol2-il)-urea) y un inhibidor de péptidos GSK-3[beta], H-KEAPPAPPQSpP-NH₂.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un diagrama de inmunotinción (1) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención que muestra la tinción de células DP y células NHEK;

La FIG. 2 es un diagrama de inmunotinción (2) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención que muestra la localización de las células de la papila capilar en la masa celular;

La FIG. 3 es un diagrama de inmunotinción (3) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención que muestra la proliferación de las células en la masa celular;

La FIG. 4 es un diagrama de inmunotinción (4) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención que muestra la tinción de β -catequina y células NHEK;

La FIG. 5 es un diagrama de inmunotinción (5) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención que muestra la expresión de la queratina capilar en la masa celular;

La FIG. 6 es un diagrama de inmunotinción (6) de una masa celular producida de acuerdo con el método de la presente invención que muestra la expresión de yemas capilares en la masa celular;

La FIG. 7 muestra la expresión de diversos genes en ARN que se originan en una masa celular de la presente invención (1);

La FIG. 8 muestra la expresión del gen Wnt3A en ARN que se origina en una masa celular de la presente invención;

La FIG. 9 muestra la expresión del gen Wnt10B en ARN que se origina en una masa celular de la presente invención; y

La FIG. 10 muestra la expresión de diversos genes en ARN que se originan en una masa celular de la presente invención (2).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse una masa celular que es capaz de servir como estructura de tipo órgano primitivo compuesta por una diversidad de tipos de células somáticas.

Las células somáticas a las que se hace alusión en la presente invención se refieren a células que han alcanzado la diferenciación en células que componen los diversos órganos del cuerpo, y se refieren a células que son lo contrario de las células madre no diferenciadas. La presente invención describe el uso de dos o más células somáticas, y preferiblemente consiste en varias combinaciones de las mismas, tales como una combinación de una línea de células epiteliales y células mesenquimales, una combinación de células endoteliales y células mesenquimales, o una combinación de células epiteliales y células mesenquimales.

No hay limitaciones particulares en cuanto a los órganos que pueden ser formados por la masa celular como se describe en el presente documento, cuyos ejemplos incluyen varios órganos tales como el folículo piloso, el pulmón, el riñón, el hígado, el páncreas, el bazo, el corazón, la vesícula biliar, el intestino delgado, el colon, el intestino grueso, las articulaciones, los huesos, los dientes, los vasos sanguíneos, el conducto linfático, la córnea, el cartílago, el órgano olfativo o el órgano auditivo.

En caso de que se desee formar un folículo piloso, se utilizan los queratinocitos de la región de la cabeza para la línea de células epiteliales, mientras que las células de la papila capilar se utilizan para las células mesenquimales. Las "células epiteliales" mencionadas en el presente documento se refieren a las células que componen la mayoría de la epidermis o epitelio de la piel, y surgen de una capa única de células basales en contacto con la dermis. Las células epiteliales pueden ser células epiteliales que se originan en los recién nacidos (o en los fetos), células que se originan en la piel madura tales como la epidermis de la piel latente o la epidermis de la piel en crecimiento, o un cultivo de células que tienen la morfología de los queratinocitos. Tales células pueden prepararse a partir de la piel de un animal donante deseado de acuerdo con métodos conocidos entre los profesionales con experiencia normal en la técnica. "Células de la papila capilar" se refiere a células situadas en la parte más inferior de los folículos pilosos como células mesenquimales que desempeñan el papel de lo que se denomina torre de control mediante el envío de señales de activación a las células madre epiteliales del folículo piloso para la auto-regeneración de los folículos pilosos. Las "células de la papila capilar" se pueden preparar, por ejemplo, preparando una suspensión de células mediante el tratamiento de una fracción de tejido dérmico, obtenido mediante la eliminación de tejido epidérmico a partir del tejido de la piel, con colágeno, y después poniendo la suspensión de células en almacenamiento congelado para destruir las células epiteliales del folículo piloso.

Además, la preparación se describe para la reconstrucción de, por ejemplo, un órgano olfativo. En primer lugar, se extirpa un sitio del tejido en el que está presente un grupo de células epiteliales olfativas de un mamífero tal como un ratón. El tejido, a continuación, se digiere mediante un tratamiento con collagenasa y se separa por centrifugación para preparar un grupo de células precipitadas. Entonces, la suspensión celular se pone en una placa de cultivo de células recubierta con colágeno 1 o 4, y la suspensión se aspira rápidamente en aproximadamente 5 minutos para permitir que se adhieran preferentemente las células epiteliales olfativas altamente adhesivas. Las células epiteliales que quedan en la misma placa se pueden transferir a un cultivo de células. Además, la mayoría de las células que quedan son células epiteliales. Aunque las células mesenquimales están presentes en la suspensión aspirada que queda, poniendo la suspensión en una placa de cultivo recubierta con fibronectina o gelatina y dejándola reposar sin perturbar durante 4 horas o más en una atmósfera adecuada, tal como a 37 °C y 95 % de CO₂, las células mesenquimales pueden ser aplicadas al cultivo de células. Las células epiteliales y mesenquimales preparadas como se ha descrito anteriormente pueden ser utilizadas para reconstruir un nuevo órgano olfativo usando un procedimiento similar al que se usa para reconstruir los órganos del folículo piloso.

La preparación también se describe para la reconstrucción, por ejemplo, de un glomérulo renal. En primer lugar, se extirpa un sitio en el que el tejido está presente en el riñón de un mamífero tal como un ratón. El tejido se digiere mediante el tratamiento con collagenasa y se separa por centrifugación seguida por la eliminación de la materia gruesa con un filtro de 100 µm de malla. Después, se recoge el glomérulo en la malla con un filtro de 40 µm de malla y se obtiene una suspensión de células mediante tratamiento con tripsina. La suspensión de células se pone en una placa de cultivo de células recubierta con colágeno 1 o 4 para adherir preferentemente las células epiteliales. Como resultado de este tratamiento, la mayoría de las células son células epiteliales que se originan en el glomérulo.

Por otra parte, en el caso del riñón, las células mesenquimales presentes en el momento de la organogénesis son destruidas en el cuerpo. Así pues, se puede emplear el procedimiento que sigue para reinducir la interacción epitelial-mesenquimal requerida para la reconstrucción del tejido. Las células renales descritas anteriormente se usan para las células epiteliales. Además, las células de la papila capilar o las células mesenquimales de la médula ósea de la misma categoría se usan como sustituto para las células mesenquimales perdidas. Las células epiteliales y mesenquimales como se han descrito anteriormente se pueden utilizar para construir un nuevo órgano renal usando una técnica similar a la usada para reconstruir órganos del folículo piloso.

Se pueden usar sin limitación diversos mamíferos como origen de las células, como se reivindica en la presente invención correspondiente a la finalidad de la misma, entre cuyos ejemplos se incluyen chimpancés, otros primates, animales domésticos tales como perros o gatos, animales de granja tales como vacas, cerdos, caballos, ovejas o cabras, animales de laboratorio tales como conejos, ratas, ratones o cobayas, y más preferiblemente ratones atómicos ("desnudos"), ratones SCID o ratas atómicas. Además, aunque sus combinaciones pueden ser combinaciones homogéneas o combinaciones heterogéneas, son preferibles las combinaciones homogéneas.

No hay limitaciones particulares en los medios de cultivo efectivos para cultivar las células somáticas como se reivindica en la presente invención, y se pueden utilizar los medios utilizados comúnmente para el cultivo de células. Por ejemplo, en caso de cultivar células mesenquimales, se puede utilizar preferentemente medios que contienen suero, tales como DMEM, MEM, F12 o medio de Chang. En este caso, la concentración en suero es de 0 a 30 % y preferiblemente 10 %, y como factores esenciales se añaden factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y L-glutamina 2 mM.

En el caso de las células epiteliales, es preferible un medio libre de suero optimizado para los queratinocitos, tal como Epilife (marca comercial registrada) y HuMedica (marca comercial registrada) (ambos disponibles de Kurabo) o Invitrogen SFM (disponible de Invitrogen). Aunque los queratinocitos se pueden preparar usando el método de Green dependiendo del caso (*Cell* 1975 Nov. 6 (13): 331-43, "Serial cultivation of strain of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells"), Rheinwalf J. G., Green H.), en este caso, puede ser utilizado para su cultivo medio que contiene suero usado en el sistema de células mesenquimales descrito

anteriormente. Además, los ejemplos de antibióticos que se pueden utilizar para el cultivo tanto de células epiteliales como de células mesenquimales incluyen penicilina G, kanamicina, estreptomycin y anfotericina B.

La presente invención se caracteriza por la adición de un activador de la señal de Wnt a una mezcla de la diversidad de células somáticas que se describió anteriormente seguida por el cultivo de las mismas. La señalización de Wnt se refiere a una serie de acciones que demuestran la función de factores de transcripción promoviendo la migración nuclear de β -catequina. Estas señales se originan de la interacción celular que incluye, por ejemplo, una serie de procesos en los que una proteína denominada Wnt3A segregada a partir de ciertas células sigue actuando sobre otras células que causan la migración nuclear de β catequina intracelular que actúa como factor de transcripción. Esta serie de procesos dan lugar al fenómeno inicial de la construcción de órganos en el ejemplo de la interacción epitelial-mesenquimal. Se sabe que la señalización de Wnt controla la proliferación y la diferenciación de las células, la formación de órganos y diversas funciones celulares tales como la migración celular durante el desarrollo inicial. Aunque la señalización de Wnt se usa cuando se cultivan células ES con el fin de inhibir la diferenciación debida a su función de mantener un estado no diferenciado (véase, por ejemplo, Noboru Sato et al., *Nature Medicine*, vol. 10, N° 1, enero 2004), su utilización y sus efectos durante el cultivo de las células somáticas son totalmente desconocidos.

No hay limitaciones concretas sobre el activador de la señal de Wnt, y se puede utilizar cualquier activador siempre y cuando demuestre actividad inhibidora sobre la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3), los ejemplos de los cuales incluyen un compuesto de bis-indolo (indirrubina), (BIO) ((2'Z,3'E)-6-bromoindirrubin-3'-oxima), su análogo de acetoxima, BIO-acetoxima (2'Z,3'E)-6-bromoindirrubin-3'-acetoxima, análogo de tiadiazolidina (TDZD) (4-bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona) y análogo de oxotiadiazolidin-3-tiona (2,4-dibencil-5-oxotiazolidin-3-tiona), un compuesto tienil α -clorometil cetona (2-cloro-1-(4,4-dibromo-tiofen-2-il)-etanona), un compuesto α -bromometil fenil cetona (α -4-dibromoacetofenona), compuesto de urea que contiene tiazol (N-4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)urea) e inhibidores de péptidos GSK-3 β tales como H-KEAPPAPPQSpP-NH₂.

No hay limitaciones particulares acerca de la cantidad de activador de señales de Wnt añadido, y se requiere que la cantidad añadida sea una cantidad para la cual se demuestre la activación de la señal de Wnt, o, en otras palabras, la inhibición de GSK-3, y no se interrumpe la proliferación celular, es dependiente del tipo de células a desarrollar, y es determinada adecuadamente por un profesional con una experiencia normal en la técnica. Por ejemplo, en el caso de usarse BIO para el activador de la señal de Wnt en células de la papila capilar, aunque es adecuada una cantidad añadida de, por ejemplo, aproximadamente 0,1 a 10 μ M, la cantidad añadida no se limita naturalmente a ella.

Otra característica de la presente invención es el someter la mezcla de la diversidad de células somáticas, a las cuales se ha añadido el activador de la señal de Wnt, a cultivo sin contacto de placa. El cultivo sin contacto de placa se refiere a un método de cultivo de células sobre una interfaz que tiene una superficie esférica de forma que no permite la adhesión de las células que se adhieren a la placa. Un ejemplo de cultivo sin contacto de placa es el método de la gota colgante (Keller, G. M. et al., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 862-869 (1995)). El método de la gota colgante se refiere a la adhesión de una gota (típicamente de aproximadamente 25 a 35 μ L) de medio de cultivo que contiene células cultivadas en el interior de la tapa superior de una placa de cultivo, cerrando cuidadosamente la tapa para que el medio de cultivo no caiga o resbale, y el cultivo de células en el medio de cultivo para ser cultivadas en forma de una gota invertida debido a la tensión superficial. Como resultado de esta manera de cultivo, el efecto sobre las células atribuible al contacto con una superficie plana como en el caso de cultivo en placa puede ser reducido al mínimo. Otros ejemplos de métodos de cultivo sin contacto con la placa incluyen un método de formación que utiliza una placa de cultivo celular semi-esférica que ha sido tratada de antemano en superficie para evitar la adhesión celular (por ejemplo, "Spheroid" disponible comercialmente de Sumitomo Bakelite) (denominado método de formación de esferoides), y un método de suspensión en el que las células son agregadas en estado de suspensión mediante el cultivo en un medio de nitrocelulosa.

Aunque la temperatura y la duración del cultivo sin contacto con la placa varía dependiendo del tipo de células que se manipulen y del número de veces que han sido subcultivadas, el cultivo se lleva a cabo, por ejemplo, a 37 °C durante 1 a 10 días y preferiblemente durante 3 a 7 días, y el medio se reemplaza adecuadamente con el mismo medio según se necesite.

Por último, las células se someten además a cultivo sin contacto con la placa en ausencia de señalización de Wnt reemplazando el medio anterior con medio de cultivo que no contiene activador de la señal de Wnt. También en este caso, aunque la temperatura y la duración del cultivo varían dependiendo del tipo de células manipuladas y del número de veces que han sido subcultivadas, el cultivo se lleva a cabo, por ejemplo, a 37 °C durante 1 a 10 días y preferiblemente durante 3 a 7 días, y el medio se reemplaza adecuadamente con el mismo medio si es necesario.

De acuerdo con el método de la presente invención, una masa celular útil, por ejemplo, para el trasplante de folículo piloso, puede ser producida de forma eficiente y artificial. Además, usando una masa celular producida artificialmente para evaluaciones de fármacos, se puede evaluar con mayor precisión la acción de un fármaco sobre los órganos del cuerpo. Además, el trasplante de la masa celular en animales inmunodeprimidos, tales como ratones atímicos o ratones SCID hace posible producir tejido similar al órgano más completo, y, produciendo ectópicamente folículo piloso humano o de riñón de ratón, por ejemplo, se pueden preparar modelos animales que permiten la

evaluación de nuevos fármacos y la evaluación de la función génica. En particular, insertando o alterando un gen en las células cuando se produce la masa celular, se pueden producir fácilmente órganos reconstruidos que tienen un gen informador, haciéndose así posible determinar con precisión e investigar el comportamiento molecular en el cuerpo en los niveles de tejido y órgano.

En la masa celular obtenida de acuerdo con el método de la presente descripción, las células epiteliales son queratinocitos y las células mesenquimales son células de la papila capilar, y en el caso de la formación de folículos pilosos que tienen una función de inducción del folículo piloso, se puede usar la masa celular para evaluar fármacos que muestran un efecto de crecimiento del pelo, y se puede usar, por ejemplo, mediante el cribado de tales fármacos. Por ejemplo, en el caso de la aplicación de un fármaco candidato de un fármaco para el crecimiento del pelo a esta masa celular y el crecimiento de la masa celular es notable en comparación con un testigo, el fármaco puede ser evaluado para que tenga un efecto de crecimiento del pelo, o puede ser evaluado en cuanto a la presencia o la ausencia de un efecto de crecimiento del pelo usando el aumento de expresión de un gen que promueve el crecimiento del pelo, tal como c-myc, como indicador o usando la inhibición de la expresión de un gen que inhibe el crecimiento del pelo, tal como BMP4 o IGFBP3, como indicador.

Ejemplos

Células de la papila capilar.

Se prepararon células de la papila capilar humana a partir del tejido del cuero cabelludo proporcionado por un donante. Después de retirar el tejido dérmico, fueron recogidos los sitios del folículo piloso presentes en el tejido graso usando pinzas y tijeras oftalmológicas bajo observación al microscopio estereoscópico. Los folículos pilosos recogidos se pasaron a un medio de cultivo que contenía antibióticos, y los sitios de células de la papila capilar se aislaron visualmente y se recogieron bajo el mismo microscopio. Las células de la papila capilar aisladas se cultivaron en el medio durante una semana o más a 37 °C y 95 % de CO₂ en una placa redonda de 10 cm (TRP), después de lo cual fueron enviadas para uso experimental. El medio usado comprendía DMEM avanzado (Invitrogen), suero bovino fetal al 15 %, 20 ng/ml de bFGF, 10 ng/ml de EGF, L-glutamina 2 mM, una mezcla de penicilina, estreptomycin y anfotericina (a una dilución de 100 veces), y 3,5 µl/50 ml de β-mercaptoetanol. Las células fueron subcultivadas adecuadamente bajo las mismas condiciones. Durante el subcultivo, las células se separaron con solución de 0,5% tripsina/EDTA, se pasaron a una placa fresca y, a continuación, se subcultivaron en medio fresco de la misma composición.

En el caso de la adición de BIO (Calbiochem), la BIO fue disuelta a 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 mM.

Queratinocitos.

Se prepararon queratinocitos de prepucio neonatal humano normal de la manera descrita a continuación. El tejido prepucial recogido de un donante se trató durante la noche a 4 °C en PBS (-) en presencia de la enzima dispasa. Sólo la epidermis se pudo recoger en forma de lámina como resultado de este tratamiento, y esta fue digerida con la enzima tripsina al 0,25% usando el mismo método que durante el subcultivo, después de lo cual el tejido y el medio se pasaron a una placa de cultivo tratada con colágeno y se cultivaron. Se utilizó para el medio Humedia KG2 (Kurabo). Las células fueron subcultivadas adecuadamente en las mismas condiciones. Durante el subcultivo, las células fueron separadas con solución de 0,5% tripsina /EDTA, se transfirieron a una placa fresca y, a continuación, se subcultivaron en un medio fresco de la misma composición. Las células recolectadas y cultivadas en la forma descrita anteriormente se usaron en la posterior experimentación.

En el caso de la adición de BIO (Calbiochem), la BIO se disolvió a 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 µM.

Cultivo en gota colgante.

Composición del medio:

DMEM avanzado al 30 % (Invitrogen), L-glutamina 2 mM, una mezcla de penicilina y estreptomycin (Invitrogen, dilución 100 veces) y 3,5 µl/50 ml de β-mercaptoetanol se mezclaron con Humedia KG-2 (Kurabo) en una relación de 1:1.

En el caso de la adición de BIO (Calbiochem), la BIO se disolvió a 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 µM.

Método de preparación:

Se prepararon células de la papila capilar a P3 o más (indicando P1 una ronda de subcultivo) en presencia o ausencia de carga de BIO, mientras que los queratinocitos se prepararon hasta P3 inclusive.

Cada una de las células se diluyó con cada medio después del tratamiento con tripsina para obtener 1 x 10⁵ células.

En el caso de la adición de BIO (Calbiochem), la BIO se disolvió a 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 μ M.

Se dispensaron de 25 a 35 μ L de cada medio de cultivo en el interior de la tapa superior de una placa de cultivo cuadrada que medía 10 cm de lado y se mezclaron para preparar gotículas en forma de cúpula de un tamaño adecuado.

Después de cerrar la tapa con cuidado, las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 95 % de CO₂ asegurándose de que no gotea el medio de cultivo.

Tres días más tarde, el medio se reemplazó con el mismo medio que se utilizó anteriormente.

Después de cultivar durante cuatro días más, una porción del medio se sometió a análisis de RT-PCR (1) como se describe más adelante. Todo el medio restante se reemplazó con medio bajo condiciones de ausencia de BIO.

El medio se reemplazó de la misma forma al tercer día, y las masas celulares que se formaron el día 7 se recogieron y se sometieron a inmunotinción como se describe a continuación.

Tinción inmunohistofluorescente:

Cada una de las masas celulares obtenidas con el método de la gota colgante se fijaron durante 5 minutos con paraformaldehído al 0,1 % y se sometieron a tinción. Además, una porción de las masas celulares se incorporó en solución de OCT sin fijar y se preparó en secciones congeladas con un criostato, seguido por inmunohistotinción.

El bloqueo se llevó a cabo durante 6 horas con PBS (-) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 13%.

Cada uno de los anticuerpos primarios indicados en la tabla que sigue fue diluido a 1/200 con el PBS (-) anteriormente mencionado que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 13 %, se añadieron a cada muestra y se dejaron reaccionar durante 4 horas a 4 °C.

Las células se lavaron tres veces con PBS (-) que contenía Tween 20 al 0,02 %.

El anticuerpo secundario fluorescente (véase el archivo Excel) diluido en 1/200 con el PBS (-) anteriormente mencionado que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 13 % fue añadido a cada muestra. Además, los núcleos de las células se tiñeron de azul con DAPI (4'-6-diamino-2-fenilindol).

Las células se observaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus).

Tabla 1

	Proteína diana	Fabricante	Descripción
Anticuerpo primario	CD49f	Serotec	antihumano de rata/CD49f de ratón
	Vimentina	YLEM	Monoclonal
	β -catequina	Becton Dickinson	Monoclonal
	Nombre	Fabricante	Descripción
Anticuerpo secundario	Conjugado de IgG anti-rata de cabra TEXAX-RED	Jackson ImmunoResearch	Rojo
	IgG anti-ratón de conejo ALEXAFLUOR 488	Invitrogen	Amarillo

En el presente documento, puesto que el anticuerpo monoclonal contra la vimentina tiñe específicamente las células de la papila capilar y el anticuerpo policlonal Cd49f tiñe específicamente las células epidérmicas, la aplicación de los anticuerpos vimentina y CD49f a la inmunocitotinción hace posible evaluar los atributos de las células presentes dentro de las masas celulares formadas en este sistema experimental.

La FIG. 1 muestra fotografías en blanco y negro de los resultados de las observaciones microscópicas descritas anteriormente. En la versión en color de este diagrama, se puede distinguir la coloración verde por el anticuerpo vimentina y la coloración roja por el anticuerpo CD49f, y se pudo determinar que cada una eran células de la papila capilar y queratinocitos, respectivamente. Además, como se muestra en la FIG. 2, se confirmó que las células de la papila capilar se agregan en la porción central de la masa celular. Como resultado de estos diagramas, se observó que las células estaban dispuestas regularmente después de haberse agregado, y se determinó que las células

epiteliales y las células mesenquimales estaban dispuestas de una manera ordenada por este sistema experimental. Después de que las masas celulares se formaran después de la adición de BIO, se determinó que los queratinocitos que tiñen de rojo crecían de una manera regular en forma de ramas dentro de masas celulares cultivadas en ausencia de BIO. Por otra parte, como se muestra en la FIG. 3, en el caso de la formación de masa celular añadiendo BIO, se encontró que una porción central en la que se había agregado papila capilar y una porción final de la masa celular que se extendía en forma de rama eran positivas para el marcador de proliferación, KI67. Sobre la base de estos resultados, aunque las células somáticas agregadas normales entran usualmente en un estado de latencia sin crecimiento, inesperadamente se encontró que ocurrió la proliferación de las células en las masas celulares debido a la adición de BIO.

Además, se utilizó el anticuerpo monoclonal β -catequina para marcar las propiedades similares a las células madre. Puesto que la β -catequina está presente en pequeñas cantidades cerca de la membrana celular de las células somáticas normales, solamente puede ser detectada ligeramente mediante inmunotinción fluorescente ordinaria. Sin embargo, en las células que tienen propiedades similares a las células madre, la β -catequina actúa como factor de transcripción dentro del núcleo y está presente en cantidades mayores. Además, como la β -catequina se acumula en el núcleo, puede confirmarse que está fuertemente localizada incluso por inmunotinción fluorescente. En este experimento, también, puesto que la β -catequina fue intensamente teñida en algunos sitios específicos de la masa celular y se confirmó que se acumulaba en esos sitios, se puede decir que la tinción con anticuerpo β -catequina es adecuada para la detección de células que tienen propiedades similares a las células madre en la masa celular.

La FIG. 4 es una fotografía en blanco y negro que muestra los resultados de la observación microscópica usando la tinción con anticuerpo monoclonal β -catequina anteriormente mencionada. En la versión en color de este diagrama, los sitios teñidos con anticuerpo β -catequina se muestran en verde, mientras que los queratinocitos se muestran en rojo. Se observaron células positivas para β -catequina en sitios que emiten una intensa luz verde, indicando así que las células tienen propiedades similares a células madre. Lo que hay que tener en cuenta aquí es la presencia de porciones en las que se observa una intensa luz amarilla en los centros de sitios esféricos de la masa celular. Estos sitios indican queratinocitos positivos para β -catequina. Se puede decir que las células positivas para β -catequina son células que tienen propiedades similares a las células madre como se describió anteriormente. Por otra parte, no hay sitios amarillos en sitios en los queratinocitos que se extienden desde la masa celular en forma de ramas. En otras palabras, puede observarse que las células que tienen propiedades similares a las células madre y las células que tienen propiedades similares a las células somáticas normales (queratinocitos) están ambas presentes. Este estado no puede ser observado durante el cultivo corriente, y la interacción epitelial-mesenquimal se reproduce como si estuviese presente in vivo, indicando así que los grupos de células indiferenciadas y diferenciadas están creciendo formando autónomamente una masa celular.

Los queratinocitos no diferenciados a los que se hace referencia en el presente documento indican células que tienen una capacidad similar a las células madre para crear constantemente queratinocitos que forman el cabello a la manera de las células de la matriz del cabello. Por otra parte, los queratinocitos diferenciados son limitados en cuanto al número de veces que proliferan, e indican las llamadas células para las que está determinado su destino celular a medida que se convierten en cabello. Al mismo tiempo, aunque se cree que las esferas verdes que rodean las células en la versión en color de la FIG. 4 son células de la papila capilar, es importante el hecho de que las células de la papila capilar en el entorno de esta masa celular son células positivas para la β -catequina, de la misma manera que la señalización de Wnt es importante durante la formación del folículo y en el comienzo del crecimiento in vivo.

El anticuerpo contra la citoqueratina 14 (K14) expresado en los queratinocitos epidérmicos y células de la vaina externa de la raíz se usa con el fin de confirmar que estas células no se han diferenciado en raíces pilosas (rojo). Puesto que el anticuerpo monoclonal AE13, que reacciona específicamente contra la queratina del cabello (Lynch et al., *J. Cell Biol.*, 103, 2.593, 1986), reconoce el dímero de queratina del pelo ácido 44K/46K, se utiliza para marcar la diferenciación en raíces del pelo (verde). La queratina del cabello es una proteína estructural específica del folículo piloso que está esencialmente ausente en los queratinocitos epidérmicos normales. La FIG. 5 es una fotografía en blanco y negro que muestra los resultados de su observación microscópica. En la versión en color de este diagrama, aunque los sitios teñidos por el anticuerpo AE13 no se observan en masas celulares producidas con células de la papila capilar y queratinocitos epidérmicos, cuando se estimulan con BIO, se observó tinción en algunas masas celulares. En masas celulares preparadas con células de la papila capilar y células de la vaina externa de la raíz, los sitios teñidos mediante anticuerpo AE13 se pueden confirmar en los casos de ausencia de estimulación BIO, y la tinción por anticuerpo AE13 se potencia considerablemente por la estimulación con BIO. Por otra parte, puesto que no se observan sitios teñidos tanto por anticuerpo K14 (rojo) como por anticuerpo AE13 (verde) (sitios amarillos) en ninguna de las masas celulares, se cree que se ha producido un cambio de células no diferenciadas que expresan citoqueratina 14 a células que producen queratina capilar.

El anticuerpo Ber-EP4 contra el antígeno epitelial humano expresado específicamente en las yemas del cabello durante la etapa de crecimiento del cabello (Ogawa, et al., *Exp. Dermatol.* 13, 401, 2004) se usa para marcar las yemas del cabello durante el crecimiento del mismo (verde). La Fig. 6 es una fotografía en blanco y negro que muestra los resultados de su observación microscópica. En la versión en color de este diagrama, la inmunotinción (verde) mediante anticuerpo Ber-EP4 se observa claramente en el caso de haber estimulado masas celulares preparadas con células de la papila capilar y células de la vaina externa de la raíz con BIO. Puesto que no se

observan sitios (amarillo) teñidos tanto por anticuerpo K14 (rojo) como por anticuerpo Ber-EP4 (verde), se cree que se ha producido un cambio de células no diferenciadas que expresan citoqueratina 14 a las células diferenciadas a yemas del cabello que expresan Ber-EP4.

Análisis de RT-PCR (1)

Se extrajo ARN de cada muestra usando Trizol (Invitrogen). Un equivalente de 200 ng de cada ARN se sometió a transcripción inversa a ADNc con un sistema de reacción que consiste en 50 µl de RevTraACE (Toyobo). Se aplicó 1 µl de las muestras resultantes a una reacción de PCR en un sistema de 50 µl usando los cebadores enumerados más adelante. Se usó KOD-DASH (Toyobo) para la enzima, y el protocolo de reacción consistió en 60 segundos a 95 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 15 segundos a 63 °C y 30 segundos a 72 °C, seguido por 60 segundos a 72 °C.

Se sometieron 10 µl de la solución de reacción a electroforesis a 100 V en gel de agarosa al 2% (CosmoBio)/tampón TAE. Se usó un marcador ladder de 100 pb (Toyobo) para el marcador de tamaño de ADN.

Los cebadores utilizados se enumeran en la tabla siguiente, y los resultados de la PCR se muestran en la FIG. 7.

Tabla 2

	Cebador Sentido (cadena directa)	Cebador anti sentido (cadena inversa)
Lef-1	gctatcaaccagattcttggcagaagg (SEQ ID N° 1)	cagctgtcattcttggacctgtacctg (SEQ ID N° 2)
SHH	ctacgagtgcaaggcacatatccactg (SEC ID N° 3)	tccaggaaagtggaggagtcgctgtag (SEC ID N° 4)
STAT-3	aagaccggcgctccagttcactactaaag (SEC ID N° 5)	ggtaagtggtgaattctgcagagagg (SEQ ID N° 6)
Versicano	tccaagttatgttggtgcactttgtgag (SEQ ID N° 7)	tcaaacatctgtcattgaggcctatcc (SEC ID N° 8)
TWIST-1	ggccaggtacatcgacttctctac (SEQ ID N° 9)	tctccttctctggaaacaatgacatc (SEQ ID N° 10)
β-actina	cgcgagaagatgaccagatcatg (SEQ ID N° 11)	ccacaggactccatgccacg (SEQ ID N° 12)

Se usó β-actina como testigo para todo el experimento.

Lef-1 es un gen secuencia abajo de la señalización de Wnt y, como se muestra en la FIG. 7, fue detectado en este sistema experimental, tanto en presencia como en ausencia de BIO. La observación de la expresión del gen Lef-1 indica que las señales de Wnt están actuando en las células. Así pues, se pueden entender que la señalización de Wnt está funcionando mediante la adición de BIO en este sistema experimental.

SHH (Sonic Hedge Hog) es un gen que participa durante la formación de tejido y, como se muestra en la FIG. 7, no fue detectado en este sistema experimental, bien sea en presencia o bien en ausencia de BIO. El SHH es un gen que se transcribe y se expresa en respuesta a las señales de Wnt y Lef-1. La expresión de este gen indica que la señalización de Wnt está actuando en las células y que está ocurriendo la expresión del gen relacionado, tal como la que se produce in vivo. Al mismo tiempo, SHH es una proteína responsable de la señalización intercelular epitelial-mesenquimal, y al mismo tiempo sugiere la aparición de interacción epitelial-mesenquimal.

STAT-3 (del inglés "Signal Transducer and Activator of Transcription 3": transductor de señales y activador de la transcripción 3) es un gen relacionado con la inducción de los folículos pilosos y, como se muestra en la FIG. 7, fue detectado principalmente en presencia de BIO, en comparación con la ausencia del mismo. STAT-3 es una denominada proteína de transducción de señal intracelular implicada en la auto-proliferación de las células madre. La aceleración de este gen es un factor esencial para la auto-proliferación y el mantenimiento de la universalidad en las células madre embrionarias, y es uno de los marcadores usados para indicar sus propiedades similares a células madre. Al mismo tiempo, como se describe en la publicación de Sano, S. et al. (*Nature Med.* 11: 43-49, 2005, "Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model"), puesto que este es también un gen extraordinariamente importante para la transición a la etapa de crecimiento del cabello, se sugiere que la aceleración de la transcripción de STAT-3 en este sistema experimental es una etapa normal durante el subsiguiente crecimiento en los folículos pilosos. Al mismo tiempo, la propia señal de STAT-3 no está directamente afectada por BIO (Sato, N. et al, *Nat. Med.* enero 2004; 10 (1): 55-63, Epub 21 de dic. de 2003, "Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3 specific inhibitor"). En otras palabras, la aceleración de STAT-3 durante la adición de BIO indica que se crea un sistema de mantenimiento de células madre dentro de las células por la interacción epitelial-mesenquimal.

TWIST-1 es el marcador para células madre mesenquimales embrionarias, y sugiere que las células de la papila capilar tienen propiedades similares a las células madre muy elevadas. Puestos que la expresión de TWIST-1 en las

- células somáticas está limitada a un tipo muy raro de células que contienen células madre mesenquimales de médula ósea, puede decirse que las células de la papila capilar son células que tienen un alto grado de propiedades similares a las células madre, a pesar de que son células somáticas. En el experimento de RT-PCR de la FIG. 7, la RT-PCR se lleva a cabo usando cantidades iguales de ARN entero para las plantillas. La razón para que la expresión parezca disminuir en presencia de BIO es debida a una disminución relativa del número de células de la papila capilar entre el número total de células, como puede observarse en la FIG. 1 y en la FIG. 2. En conclusión, incluso cuando se consideran las variaciones en las cantidades expresadas, la presencia continuada de células que expresan el gen TWIST-1 sugiere que las células de la papila capilar que pueden tener capacidades similares a las células madre siguen estando presentes en este sistema experimental.
- El gen del versicano es un marcador del crecimiento del cabello que se sabe que se expresa intensamente en células de la papila capilar durante la inducción del crecimiento del pelo (Kishimoto, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1999), p. 7.336 a 7.341). En el experimento de RT-PCR de la FIG. 7, la razón de que la expresión que aparece disminuya en presencia de BIO estriba en una disminución relativa del número de células de la papila capilar entre el número total de células, como puede observarse en la FIG. 1 y la FIG. 2. En conclusión, incluso cuando se consideran variaciones en las cantidades expresadas, la presencia continuada de células que expresan el gen de Versicano sugiere que las células de la papila capilar capaces de inducir el crecimiento del cabello siguen estando presentes en este sistema experimental.
- Basándose en los cambios en los niveles de expresión de cada gen, la indiferenciación de las células epiteliales y mesenquimales se mantiene debido a los efectos directos de BIO dentro de la masa celular, y se puede decir que ha ocurrido una acción que imita la acción epitelial-mesenquimal inducida por la señalización de Wnt. Además, puesto que se observa la aparición de propiedades similares a las células madre no relacionadas con la señalización de Wnt como con STAT-3, el efecto de BIO contribuye a la creación de una masa celular que tiene la interacción celular autónoma y la capacidad de proliferar.
- RT-PCR de Wnt3A.
- Se prepararon células de la papila capilar a P3 (indicando P1 una ronda de subcultivo) en presencia de carga de BIO, mientras que los queratinocitos se prepararon hasta P3 inclusive.
- Cada una de las células se diluyó con cada uno de los medios después del tratamiento con tripsina para obtener 3×10^3 células.
- Se disolvió BIO (Calbiochem) a 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 μ M.
- Se dispensaron 25 a 35 μ l de cada medio de cultivo en el interior de la tapa superior de una placa de cultivo cuadrada que medía 10 cm de lado y se mezclaron para preparar gotículas en forma de cúpula de un tamaño adecuado.
- Después de cerrar la tapa con cuidado, las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 95 % de CO₂ asegurándose de que no gotease el medio de cultivo.
- Tres días más tarde, el medio fue reemplazado con el mismo medio que se utilizó anteriormente. Las muestras se recogieron en el día 7º y se sometieron a análisis de RT-PCR (2) como se describe más adelante ("0 días" en la FIG. 8). El medio usado para las mismas células restantes fue reemplazado con medio bajo condiciones de ausencia de BIO para inducir la diferenciación, después de lo cual las muestras recogidas en el 3º día se sometieron a análisis de RT-PCR (2) como se describe a continuación ("3 días" en la FIG. 8).
- Análisis de RT-PCR (2)
- Se extrajo ARN de las muestras usando Trizol (Invitrogen). Un equivalente de 200 ng de cada ARN fue sometido a transcripción inversa a ADNc con un sistema de reacción que consiste en 50 μ l de RevTraACE (Toyobo). Se aplicó 1 μ l de las muestras resultantes a una reacción de PCR en un sistema de 50 μ l usando los cebadores enumerados más adelante. Se utilizó KOD-DASH (Toyobo) para la enzima, y el protocolo de reacción consistió en 2 minutos a 94 °C, 32 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 10 segundos a 63 °C y 30 segundos a 72 °C, seguido por 2 minutos a 72 °C.
- Cebador Sentido (cadena directa):
- caggaactacgtggagatcatg (SEC ID NO. 13)
- Cebador Antisentido (cadena inversa):
- ccatcccacaaaactcgatgtc (SEC ID NO. 14)
- Se sometieron a electroforesis 10 μ l de la solución de reacción a 100 V en gel de agarosa al 2% (CosmoBio)/tampón TAE. Se detectaron bandas diana después de la visualización con bromuro de etidio.

Los resultados se muestran en la FIG. 8. La flecha en el dibujo indica una banda de Wnt3A. La propia expresión de Wnt3A es rara, se expresa principalmente por células epiteliales, y se sabe que es un gen implicado en la organogénesis y la interacción de células epiteliales-células mesenquimales. Como se muestra en el dibujo, al contrario que con la expresión de Wnt3A que no se observa en absoluto en células en las que se activó la señalización de Wnt cultivando en presencia de BIO, se observó la expresión de Wnt3A en células en las que la diferenciación celular fue inducida subsiguientemente mediante la eliminación de BIO. En consecuencia, en este sistema experimental, se determinó claramente que la diferenciación de queratinocitos y, lo que es más, la organogénesis autónoma son inducidas por el cultivo en presencia de BIO seguido de cultivo después de la eliminación de BIO.

10 RT-PCR de Wnt10B

Se prepararon células de la papila capilar a P3 (indicando P1 una ronda de subcultivo) en ausencia de carga de BIO, mientras que las células de la vaina externa de la raíz se prepararon hasta P3 inclusive.

Cada una de las células se diluyó con cada medio después del tratamiento con tripsina con el fin de obtener 3×10^3 células.

15 Se disolvió BIO (Calbiochem) a 10 mM con dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadió a una concentración de 0,1 a 5 μ M.

Se dispensaron 25 a 35 μ l de cada medio de cultivo en el interior de la tapa superior de una placa de cultivo cuadrada que medía 10 cm de lado y se mezclaron para preparar gotículas en forma de cúpula de un tamaño adecuado.

20 Después de cerrar la tapa con cuidado, las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 95 % de CO₂ asegurándose de que no gotease el medio de cultivo.

Tres días más tarde, el medio fue reemplazado con el mismo medio que se utilizó anteriormente. Las muestras se recogieron en el séptimo día y se sometieron a análisis de RT-PCR (3), como se describe más adelante ("día 7" en la FIG. 9). El medio usado para las mismas células restantes se reemplazó con medio sin BIO para inducir la diferenciación, después de lo cual las muestras recogidas después de 10 y 14 días se sometieron a análisis de RT-PCR (3) como se describe más adelante ("día 10" y "día 14" en la FIG. 9).

25 Análisis de RT-PCR (3)

Se extrajo ARN de cada muestra usando Trizol (Invitrogen). Un equivalente de 200 ng de cada ARN se sometió a transcripción inversa a ADNC con un sistema de reacción que consiste en 50 μ l de RevTraACE (Toyobo). Se aplicaron 4 μ l de las muestras resultantes a un sistema de PCR cuantitativa (LightCycler System, Roche) en un sistema de 20 μ l usando los cebadores enumerados a continuación. Se usó el protocolo de reacción de LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green (Roche) (consistente en 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 10 segundos a 63 °C y 15 segundos a 72 °C).

30 Cebador Sentido (cadena directa):

gaagtctctcgggatttcttgatcc (SEC ID NO. 15)

35 Cebador Antisentido (cadena inversa):

cgggttgggatcaatgaagatgg (SEC ID NO. 16)

Los resultados se muestran en la FIG. 9. Todos los datos fueron expresados como la cantidad relativa expresada basándose en la cantidad expresada después de 3 días en el caso de no cargar la masa celular con BIO. Wnt10B se expresa principalmente por células epiteliales durante las etapas de morfogénesis del folículo piloso y el crecimiento del cabello, y se sabe que es un gen implicado en una interacción célula epitelial-célula mesenquimal. Como se muestra en el dibujo, al contrario que con la expresión de Wnt10B que sólo se observa que se expresa a aproximadamente el mismo nivel que el de un testigo cultivado en ausencia de BIO en células en las que la señalización de Wnt fue activada cultivando en presencia de BIO siempre y cuando las células fuesen cultivadas en presencia de BIO, la expresión de Wnt10B aumentó a lo largo del tiempo en las células en las que la diferenciación celular fue subsiguientemente inducida eliminando la BIO. En consecuencia, en este sistema experimental, se determinó claramente que la diferenciación de las células epiteliales foliculares (células de la vaina externa de la raíz) y, lo que es más, la organogénesis autónoma son inducidas cultivando en presencia de BIO seguido de cultivo después de la eliminación de BIO.

45 Reactividad de la masa celular ante el estimulador del crecimiento del cabello, ciclosporina A

50 Se sabe que la hipertrichosis es un efecto secundario del inmunosupresor ciclosporina A (Lutz, et al., *Skin Pharmacol.* 7, 101, 1994), y se ha determinado claramente que la ciclosporina A muestra una acción de crecimiento del cabello (Paus, et al., *Lab. Invest.* 60, 365, 1989) y una acción de promoción del crecimiento del cabello (Taylor, et al., *J. Invest. Dermatol.*, 100, 237, 1993).

Se prepararon células de la papila capilar a P3 (indicando P1 una ronda de subcultivo) en ausencia de carga de BIO, mientras que se prepararon células de la vaina externa de la raíz hasta P3 inclusive.

Cada una de las células se diluyó con cada medio después del tratamiento con tripsina para obtener 3×10^3 células.

- 5 Se dispensaron 25 a 35 μ l de cada medio de cultivo en el interior de la tapa superior de una placa de cultivo cuadrada que medía 10 cm de lado y se mezclaron para preparar gotículas en forma de cúpula de un tamaño adecuado.

Después de cerrar la tapa con cuidado, las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 95 % de CO₂ asegurándose de que no gotease el medio de cultivo.

- 10 Tres días más tarde, el medio fue reemplazado con el mismo medio que se utilizó anteriormente, que contiene ciclosporina A. La ciclosporina A se disolvió a 10 mM con etanol y se añadió a una concentración de 0,1 a 10 μ M.

Las muestras se recogieron tres días después de la adición de ciclosporina A y sometieron a análisis mediante RT-PCR (4) como se describe a continuación.

Análisis de RT-PCR (4)

- 15 Se extrajo ARN de las muestras usando el *kit* RNeasy (Qiagen). Un equivalente de 200 ng de cada ARN se sometió a transcripción inversa a ADNc con un sistema de reacción que consiste en 20 μ l de Superscript II (Invitrogen). Se aplicó 1 μ l de las muestras resultantes a un sistema de PCR cuantitativa (LightCycler System, Roche) en un sistema de 20 μ l usando los cebadores enumerados más adelante. Se usó el protocolo de reacción de LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green (Roche) (consistente en 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 10 segundos a 58 °C y 15 segundos a 72 °C).

- 20 BMP4:

Cebador Sentido (cadena directa):

gggcacctcatcacacgact (SEC ID NO. 17)

Cebador Antisentido (cadena inversa):

ggcccaattccactccctt (SEC ID N ° 18)

- 25 c-myc:

Cebador Sentido (cadena directa):

ttctctcgtcctcggaattctctg (SEC ID NO. 19)

Cebador Antisentido (cadena inversa):

cagcagaaggtgatccagactctgac (SEC ID N ° 20)

- 30 IGFBP3:

Cebador Sentido (cadena directa):

acagccagcgctacaaagtt (SEC ID NO. 21)

Cebador Antisentido (cadena inversa):

tagcagtgcacgtcctcctt (SEC ID NO. 22)

- 35 Los resultados se muestran en la FIG. 10. Todos los datos se expresaron como cantidad relativa expresada basándose en el caso de la no adición de ciclosporina A. Se sabe que BMP4 es un gen que es expresado principalmente por células de la papila capilar durante las etapas de la morfogénesis del folículo piloso y de crecimiento del pelo y actúa para inhibir la interacción de célula epitelial-célula mesenquimal (Hens, et al., *Development* 134, 1.221, 2007). Como se muestra en el dibujo, la cantidad expresada de BMP4 disminuyó
- 40 significativamente hasta aproximadamente el 60 %. Además, se sabe que c-myc es un gen que se expresa fuertemente en la región de la protuberancia durante la etapa de desarrollo del pelo y en las células de la matriz del pelo durante la etapa de crecimiento, y actúa positivamente sobre la proliferación de las células epiteliales foliculares (Bull, J.J. et al., *Invest. Dermatol.* 116, 617, 2001). Como se muestra en el dibujo, la expresión de c-myc aumentó
- 45 hasta aproximadamente 1,5 veces la del testigo. Además, se sabe que IGFBP3 es el factor que inhibe el crecimiento del cabello (Weger, et al., *J. Invest. Dermatol.* 125, 847, 2005), y se ha demostrado claramente que su expresión aumenta durante la fase de latencia (Schlake, et al., *Gene Expr. Patterns* 4, 141, 2004). Como se muestra en el dibujo, la expresión de IGFBP3 disminuyó significativamente hasta aproximadamente el 60 %. En consecuencia, se

determinó que los genes implicados en el desarrollo del cabello y el crecimiento del cabello usados en este sistema experimental son alterados por la ciclosporina A, demostrándose así que este sistema experimental puede ser usado para evaluar los efectos de fármacos sobre el desarrollo del cabello y el crecimiento del cabello.

Listado de secuencias

- 5 <110> SHISEIDO CO. LTD
- <120> Grupo de células que comprende una diversidad de tipos de células de origen somático con capacidad de formar una estructura de tipo órgano primitivo
- <130> T765
- <150> JP2006-176763
- 10 <151> 2006-06-27
- <160> 22
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 27
- 15 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador Sentido
- <400> 1
- 20 gctatcaacc agattcttgg cagaagg 27
- <210> 2
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 25 <220>
- <223> Cebador Antisentido
- <400> 2
- cagctgtcat tcttgacct gtacctg 27
- <210> 3
- 30 <211> 27
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador Sentido
- 35 <400> 3
- ctacgagtcc aaggcacata tccactg 27
- <210> 4
- <211> 27
- <212> ADN
- 40 <213> Artificial
- <220>
- <223> Cebador Antisentido
- <400> 4
- tccaggaaag tgaggaagtc gctgtag 27
- 45 <210> 5
- <211> 28
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador Sentido

 <400> 5
 aagaccggcg tccagttcac tactaaag 28

 5 <210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 10 <223> Cebador Antisentido

 <400> 6
 ggtcaagtgt ttgaattctg cagagagg 28

 <210> 7
 <211> 28
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador Sentido

 <400> 7
 20 tccaagttat gttggtgcac ttgtgag 28

 <210> 8
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Cebador Antisentido

 <400> 8
 tcaaacatct tgtcattgag gcctatcc 28

 <210> 9
 30 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador Sentido

 35 <400> 9
 ggccaggtag atcgactcc tctac 25

 <210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador Antisentido

 <400> 10
 tctcctctc tggaacaat gacatc 26

 45 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> Cebador Sentido

<400> 11
 cgcgagaaga tgaccagat catg 24

 <210> 12
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador Antisentido

 <400> 12
 10 ccacaggact ccatgcccac g 21

 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Cebador Sentido

 <400> 13
 caggaactac gtggagatca tg 22

 20 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador Antisentido

 25 <400> 14
 ccatcccacc aaaactgat gtc 23

 <210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador Sentido

 <400> 15
 gaagttctct cggttattct tggatcc 27

 35 <210> 16
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Cebador Antisentido

 <400> 16
 cggttggtggg tatcaatgaa gatgg 25

 <210> 17
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador Sentido

 <400> 17
 50 gggcacctca tcacacgact 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador Antisentido

<400> 18
 ggcccaattc ccactccctt 20

10 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador Sentido

15 <400> 19
 ttctctccgt cctcggattc tctg 24

<210> 20
 <211> 26
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador Antisentido

<400> 20
 cagcagaagg tgatccagac tctgac 26

25 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 30 <223> Cebador Sentido

<400> 21
 acagccagcg ctacaaagtt 20

<210> 22
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador Antisentido

<400> 22
 40 tagcagtgca cgtcctcctt 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una masa celular capaz de servir como estructura de tipo de órgano primitivo compuesta de combinaciones de células de vaina externa de la raíz (ORS) y células de la papila capilar, que comprende:

preparar cultivos que contienen células de la vaina externa de la raíz (ORS) y células de la papila capilar;

- 5 mezclar los cultivos de vaina externa de la raíz y de célula de la papila capilar y seguido de adición de un activador de la señal de Wnt que demuestra una actividad inhibidora sobre la GSK-3 al cultivo mixto de células;

someter el cultivo que contiene el dicho activador de la señal de Wnt al cultivo mediante un método de la gota colgante o método de formación de esferoides durante un período de tiempo predeterminado; y

- 10 reemplazar el medio del cultivo cultivado por un método de la gota colgante o método de formación de esferoides con medio que no contiene activador de la señal de Wnt y seguir cultivando durante un periodo de tiempo predeterminado; en el que,

al menos un tipo de las células ORS y células de papila capilar se mantiene en un estado no diferenciado.

2. El método según la reivindicación 1, en el que el activador de la señal de Wnt que demuestra una actividad inhibidora sobre GSK-3 es 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO).

- 15 3. El método según la reivindicación 1, en el que los folículos pilosos que tienen un folículo piloso que induce la función se forman a partir de la masa celular.

4. El método según la reivindicación 1, en el que el activador de la señal de Wnt que demuestra una actividad inhibidora sobre GSK-3 se selecciona del compuesto bis-indolo (indirrubina), (2'Z,3'E)-6-bromoindirrubin-3'-oxima (2'Z,3'E)-6-bromoindirrubin-3'-acetoxima, 4-bencil-2-etil-1,2,4-tiadiazolidin-3,5-diona, 2,4-dibencil-5-oxotiazolidin-3-tiona, 2-cloro-1-(4,4-dibromo-tiofen-2-il)-etanona, [alfa]-4-dibromoacetofenona, N-(4-metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il-urea) y un inhibidor de péptido GSK-3[beta], H-KEAPPAPPQSpP-NH₂.

20

Fig.1

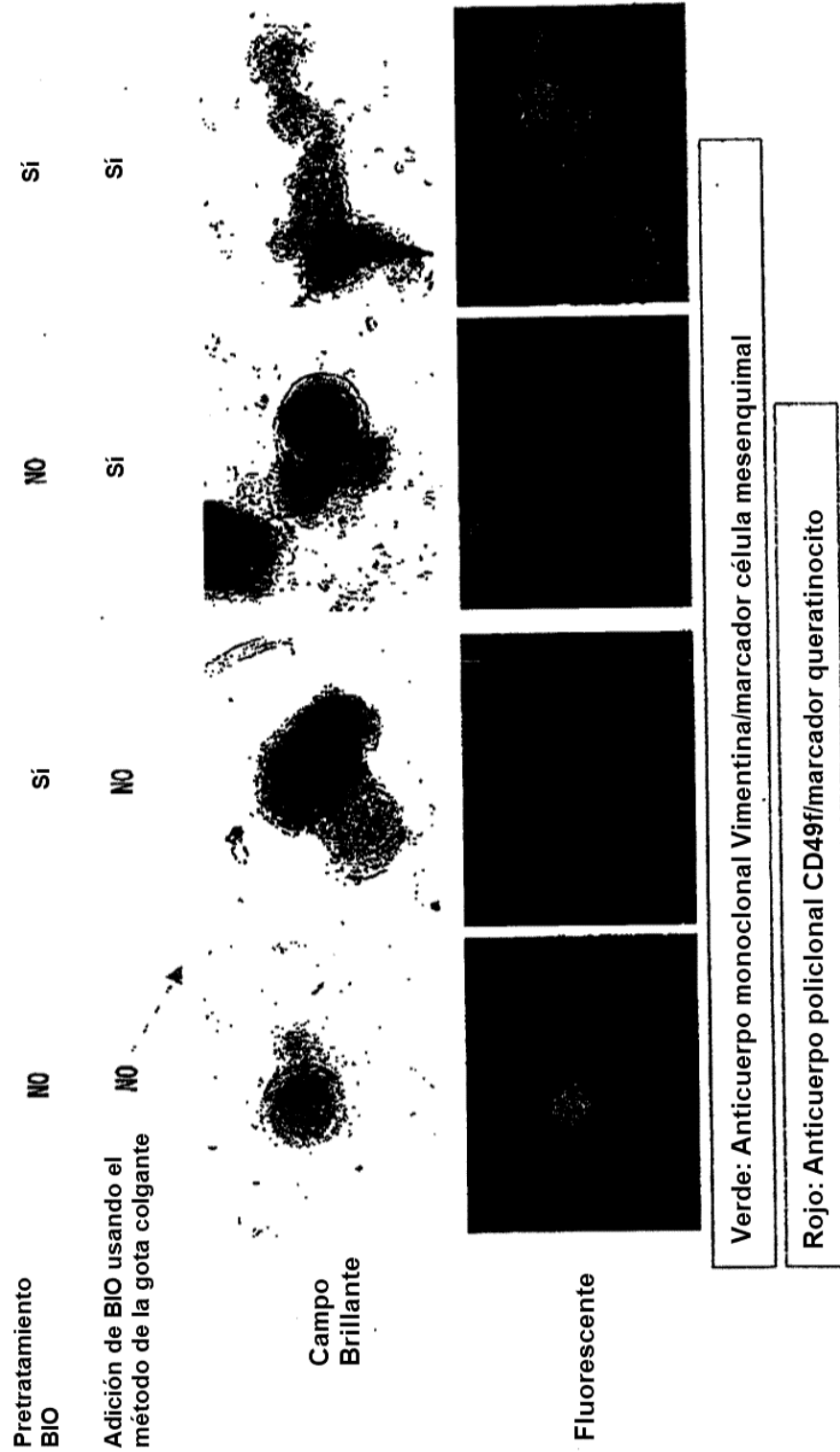
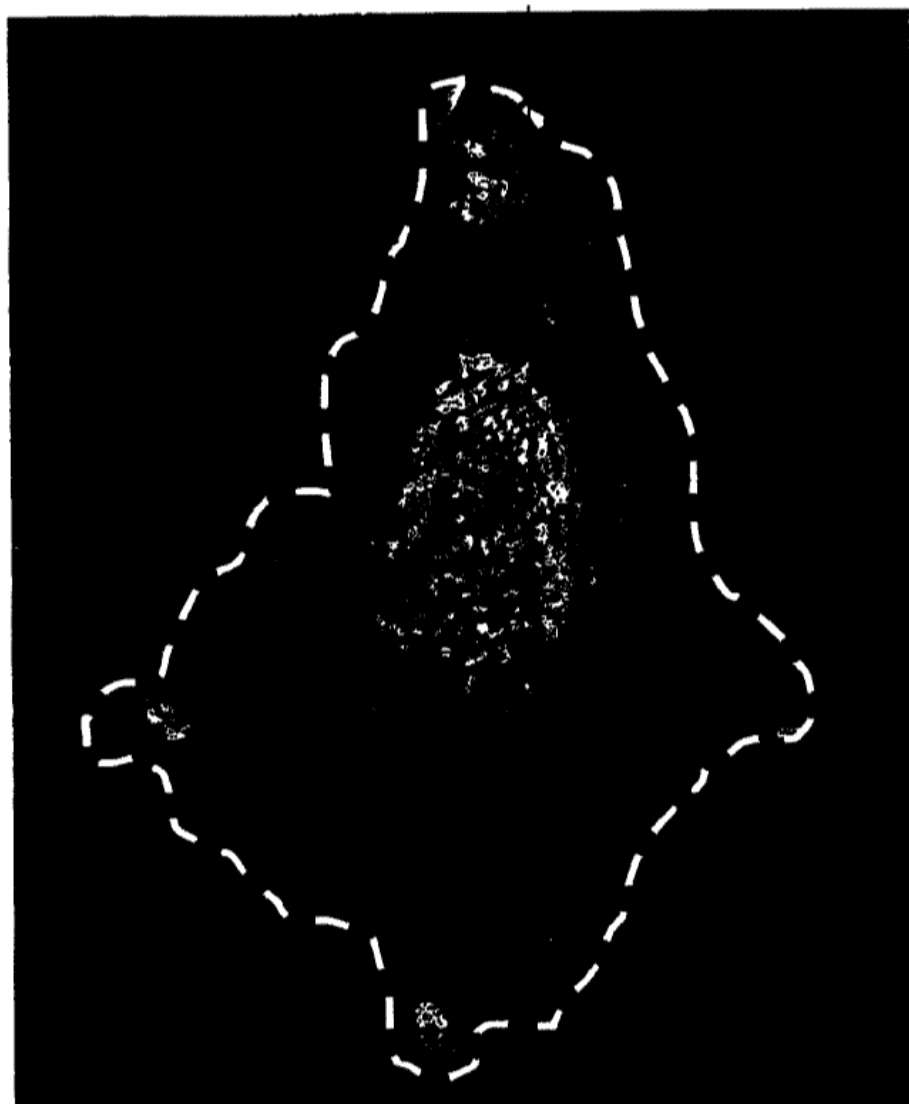


Fig.2



: Célula de la papila capilar

Fig.3

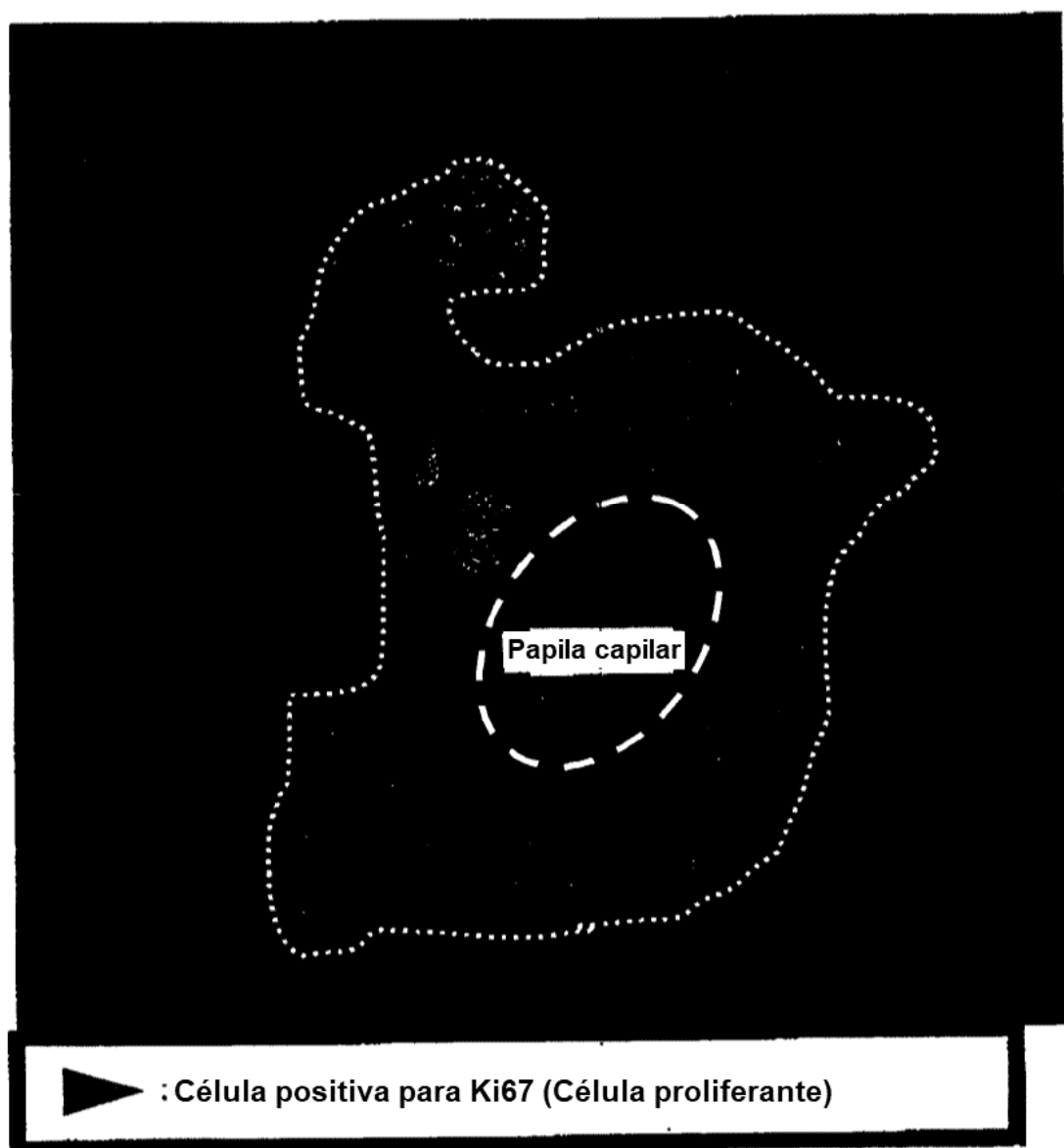


Fig.4

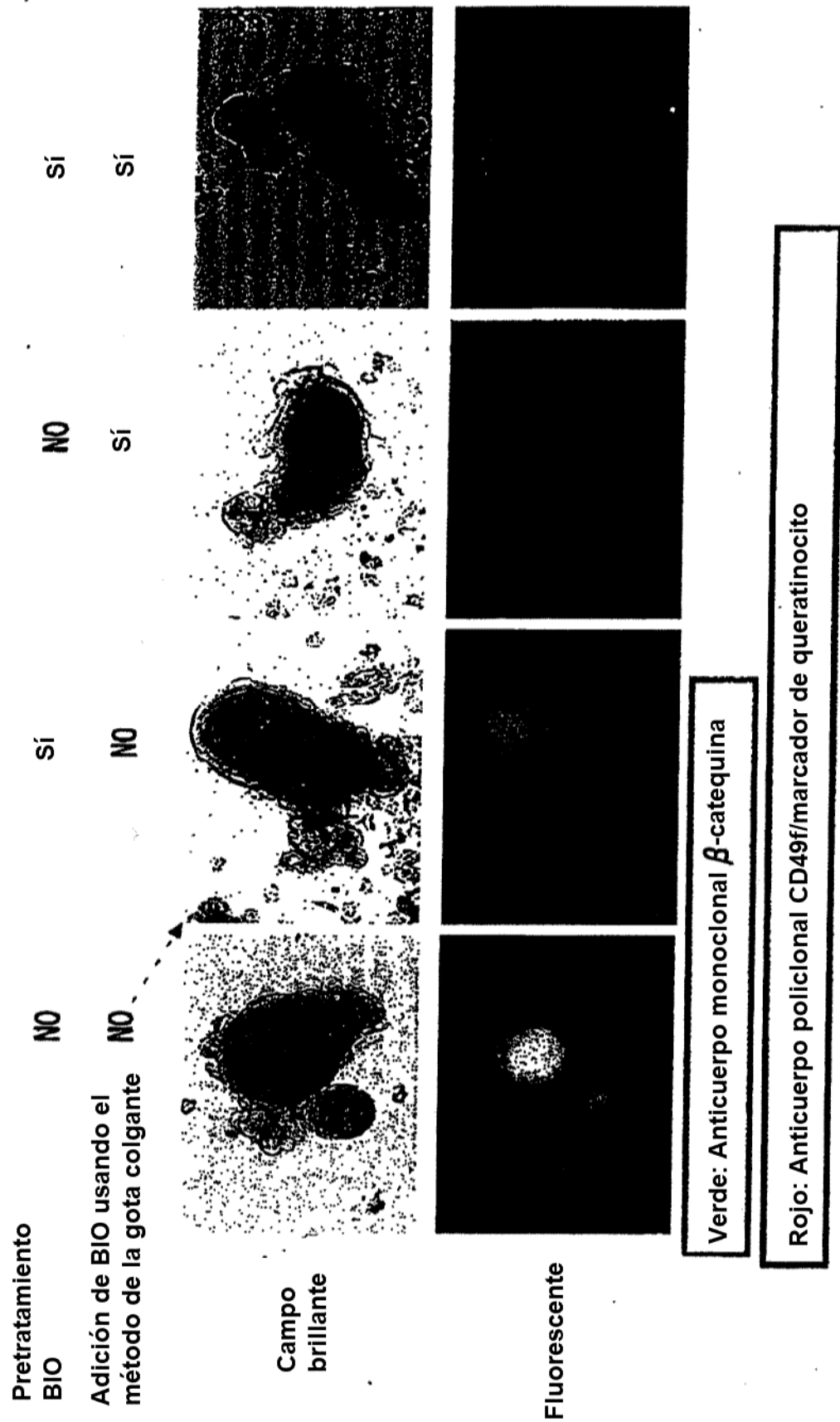
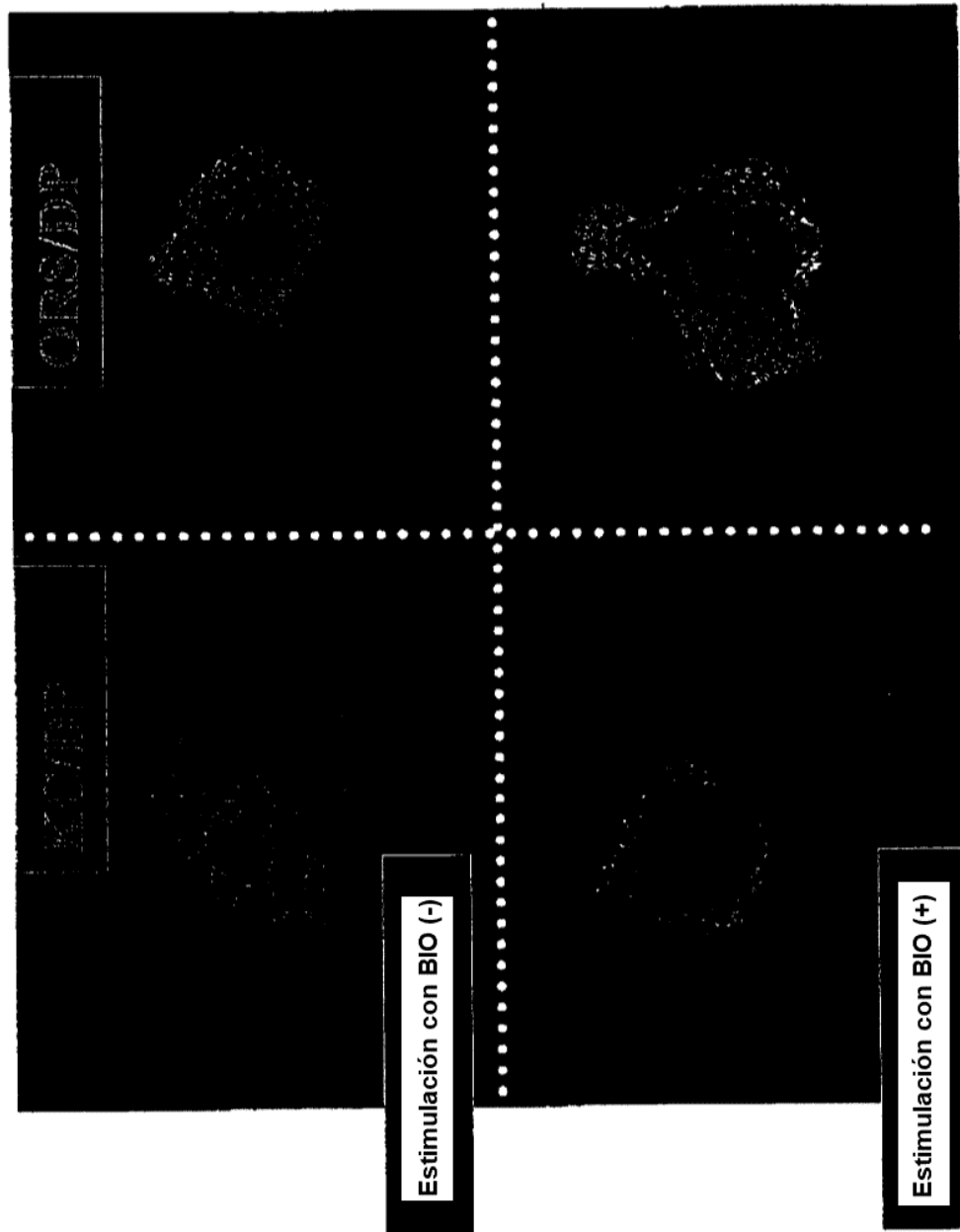


Fig.5



K14 AE13

Fig.6

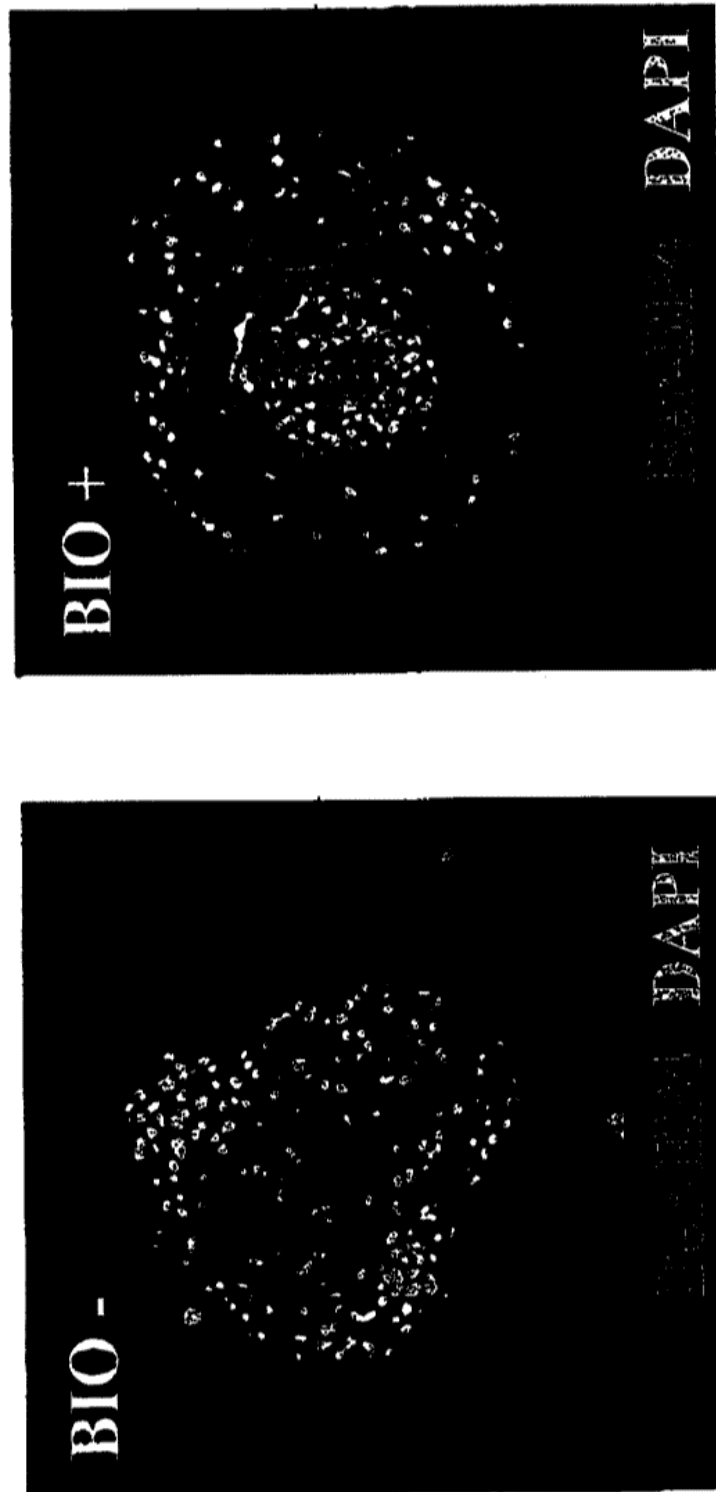
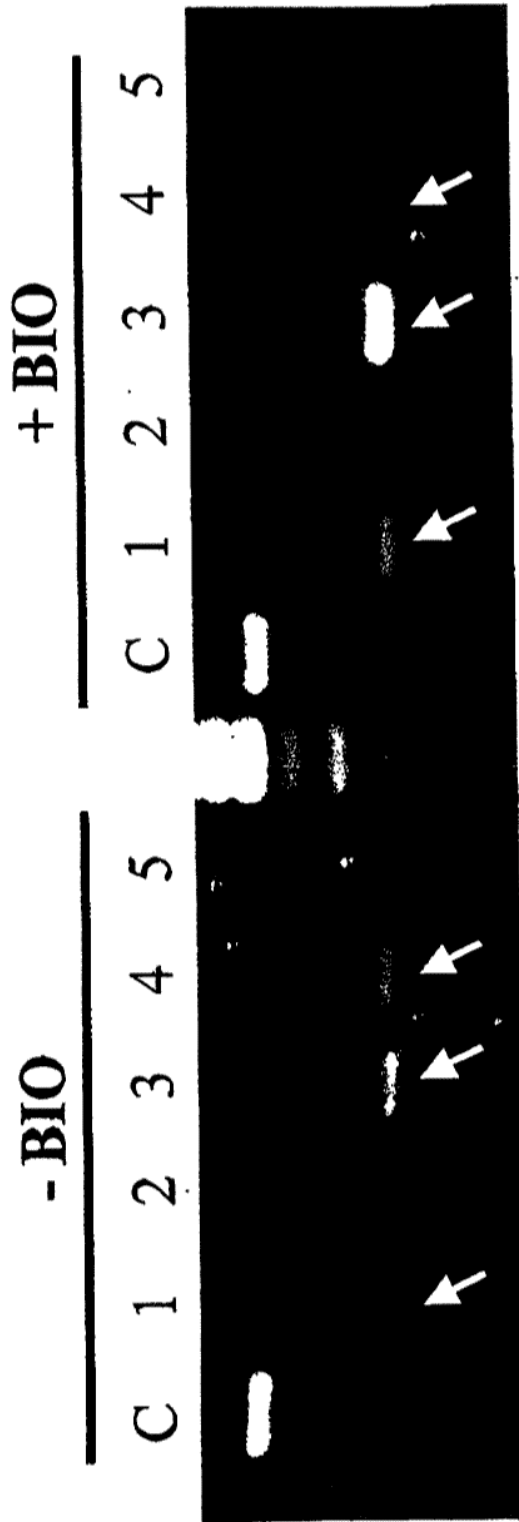


Fig.7

RT-PCR



C. bActina

1. Lef-1: gen secuencia abajo de señalización de Wnt

2. SHH: Gen implicado durante la formación de tejido

3. STAT-3: relacionado con la inducción de folículos capilares

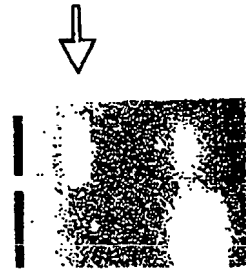
4. Twist-1: marcador de células mesenquimales + marcador de conexión de diferenciación

5. Versicano: gen expresado durante la inducción del folículo capilar

Fig.8

Producción de masa celular por el método de la gota colgante BIO (+) 1 semana

BIO (-) (Comienzo de la diferenciación) 0 días 3 días



Wnt3a / RT-PCR

Wnt3a es un gen expresado raramente implicado en organogénesis e interacción epitelial-mesenquimal (EMI)

BIO (+) > mantenimiento de estado indiferenciado > formación de masa celular



BIO (-) > Comienzo de la diferenciación > promoción de la interacción intracelular similar a EMI

Fig.9

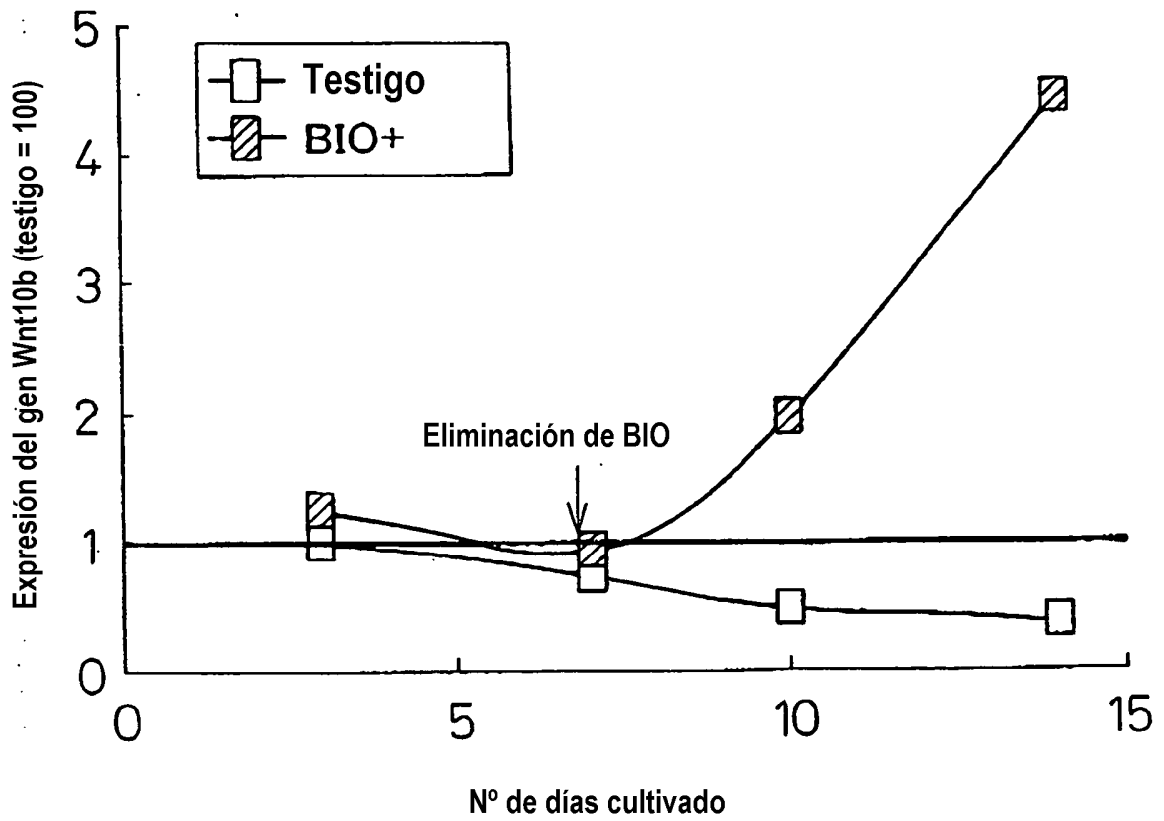


Fig.10

