

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 330**

51 Int. Cl.:

A61K 35/32	(2015.01) C12N 5/00	(2006.01)
A61K 38/27	(2006.01)	
A61P 9/10	(2006.01)	
A61P 17/00	(2006.01)	
A61P 19/08	(2006.01)	
A61P 25/00	(2006.01)	
A61P 25/28	(2006.01)	
A61P 27/02	(2006.01)	
A61K 38/18	(2006.01)	
A61K 9/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2011 PCT/JP2011/057412**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11118795**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 11759599 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018 EP 2554175**

54 Título: **Composición para el tratamiento de una parte dañada**

30 Prioridad:

23.02.2011 JP 2011037028
31.01.2011 US 437697 P
01.12.2010 JP 2010267962
05.11.2010 US 410370 P
26.03.2010 US 317713 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2018

73 Titular/es:

TOKUSHIMA UNIVERSITY (100.0%)
2-24, Shinkura-cho, Tokushima-shi
Tokushima 770-8501, JP

72 Inventor/es:

UEDA, MINORU;
YAMADA, YOICHI;
EBISAWA, KATSUMI;
YAMAMOTO, AKIHITO;
SAKAI, KIYOSHI;
MATSUBARA, KOHKI;
HATTORI, HISASHI;
SUGIYAMA, MASAHICO y
INOUE, TAKANORI

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 663 330 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

Composición para el tratamiento de una parte dañada

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición para el uso en el tratamiento de una parte dañada.

10 La medicina regenerativa que utiliza células madre atrae la atención como una técnica alternativa versátil para las enfermedades que son difíciles de tratar con la medicina convencional.

15 La medicina regenerativa que utiliza células madre es una herramienta prometedora en una nueva plataforma clínica para todo un espectro de enfermedades intratables. Se han informado varias células madre, incluidas células madre embrionarias (células ES), células madre pluripotentes inducidas (células iPS) y células madre somáticas. Entre las células madre somáticas, las células madre mesenquimales (MSC) aisladas de diversos tejidos, incluyendo la médula ósea, el tejido adiposo, la piel, el cordón umbilical y la placenta, se han usado en particular en aplicaciones clínicas en la regeneración de la piel. Sin embargo, la aspiración de médula ósea es un procedimiento invasivo y doloroso para el donante. Además, el número y el potencial de proliferación y diferenciación de las células madre de la médula ósea (BMSC) disminuyen con el aumento de la edad.

20 Hay muchas enfermedades a las que la medicina regenerativa es aplicable o se espera que sean aplicables, y se han llevado a cabo diversas investigaciones para su aplicación clínica. Un trastorno neurológico, en particular un trastorno neurológico intratable como la lesión de la médula espinal, es una de las enfermedades a las que se espera que se aplique la terapia con medicina regenerativa.

25 La terapia de trasplante de un trastorno neurológico intratable utilizando células madre neuronales de embriones humanos o células ES (por ejemplo, la Solicitud de Patente Japonesa abierta a consulta pública (JP-A) No. 2002-281962) se reconoce como un objetivo de investigación realista, pero tiene un serio problema en términos de moralidad y seguridad. Por lo tanto, todavía se busca una "fuente de células madre" práctica (por ejemplo, Japanese Patent Application Laid-open (JP-A) No. 2002-281962) is recognized as a realistic research target, but has a serious problem in terms of morality and safety. Therefore, practical "stem cell source" is still searched for (for example, Keirstead et al., Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury, Journal of Neuroscience (2005) vol. 25 (19) pp. 4694; Okano et al., Neural stem cells and regeneration of injured spinal cord, Kidney international (2005), Vol.68, pp.1927-1931; Okada et al., Spatiotemporal recapitulation of central nervous system development by murine embryonic stem cell derived neural stem and progenitor cells, Stem Cells (2008) vol. 26 (12) pp. 3086-3098).

40 Los ejemplos de células madre en un organismo vivo incluyen células madre derivadas de médula ósea o tejido adiposo (por ejemplo, folleto de Publicación Internacional 02/086108). Estas células madre tienen deficiencias tales como (1) reducción con la edad en el número de células madre que se pueden obtener, (2) dificultad en términos de garantizar la seguridad de las células madre trasplantadas que se pueden obtener. (2) dificultad en términos de garantizar la seguridad de las células madre trasplantadas debido a la acumulación de mutaciones genéticas con la edad, (3) baja capacidad proliferativa de las células y (4) invasión corporal severa que acompaña a la recolección de células madre (por ejemplo, Gronthos et al., Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, Proc Natl Acad Sci USA (2000) vol. 97 (25) pp. 13625-13630; Miura et al., SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth, Proceedings of the National Academy of Sciences (2003) Vol.100, 5807-5812). El desarrollo de un nuevo rutina de células madre para el tratamiento de trastornos neurológicos intratables para resolver estos problemas es importante.

50 Las células madre de los dientes deciduos exfoliados humanos (SHED) y las células madre de la pulpa dental de los dientes permanentes (DPSCs) derivadas de la muela del juicio, que son desechos médicos, se identificaron como nuevos grupos de células madre con capacidad de autorrenovación y pluripotencia similares a las BMSC.

55 Estas células son grupos celulares derivados de la cresta neural y exhiben propiedades similares al linaje neural y alta reactividad a la inducción de la diferenciación neuronal (por ejemplo, Miura et al., SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth, Proceedings of the National Academy of Sciences (2003) Vol.100, 5807-5812; Arthur et al., Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues, Stem Cells (2008) vol. 26 (7) pp. 1787-1795). Como SHED y DPSC son células madre de tejido derivadas de sí mismas, la seguridad en el caso del trasplante es alta, y está involucrado un difícil problema moral.

60 Sin embargo, en el estudio convencional sobre SHED y DPSC, no hay más hallazgo que el análisis fragmentario del linaje de células neuronales, o la observación de injerto de SHED o DPSC inducidas por diferenciación neuronal trasplantadas en roedores (Por ejemplo, Arthur et al., Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues, Stem Cells (2008) vol. 26 (7) pp. 1787-1795; Huang et al., Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice, Stem Cells (2008) vol. 26 (10) pp. 2654-2663)

Además, hay informes de que las DPSC tienen potencial para emplearse en el tratamiento basado en células para trastornos sistémicos tales como trastornos neuronales y enfermedades cardíacas, y que las DPSC mejoran los trastornos isquémicos (Arthur et al., Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues, *Stem Cells* (2008) vol. 26 (7) pp. 1787-1795; Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, et al., Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarct, *Stem Cells* 2008; 26: 638-645; Iohara K, Zheng L, Wake H, et al., A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp, *Stem Cells* 2008; 26:2408-2418).

Investigaciones recientes han indicado que las MSC pueden contribuir a la reparación de la piel. Además, la cicatrización de heridas mediante la aplicación externa de diversos factores de crecimiento está ampliamente estudiada. Sin embargo, el resultado del uso de factores de crecimiento en administración única o administraciones múltiples, o el resultado del uso de múltiples factores de crecimiento en combinación con vistas a obtener efectos sinérgicos, no se ha confirmado clínicamente.

Además, el tratamiento de un grupo de población anciana que ha estado excesivamente expuesto a la luz solar es un gran foco de productos cosmecéuticos y dermatológicos. Diversos tratamientos no invasivos y productos cosmecéuticos tópicos se utilizan para tratar algunos de los síntomas de la piel fotoenvejecida, tal como las arrugas (Chung JH, Youn SH, Kwon OS, Cho KH, Youn JI, Eun HC., Regulations of collagen synthesis by ascorbic acid, transforming growth factor-beta and interferon-gamma in human dermal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel are photoaging- and aging-independent, *J Dermatol Sci* 1997;15: 188-200; Fitzpatrick RE, Rostan EF., Reversal of photodamage with topical growth factors: a pilot study, *J Cosmet Laser Ther* 2003; 5: 25-34).

Se sabe que la exposición a los rayos ultravioleta de longitud de onda corta (UVB), que es una de las razones del envejecimiento, estimula la producción de colagenasa por los fibroblastos dérmicos humanos (HDF) en la dermis y regula positivamente la expresión de un gen colagenasa. Se considera que esto induce la degradación del colágeno y la deposición de un tejido elástico degenerado que aparece como arrugas y coloración amarillenta de la piel.

Estudios previos indican que las MSC producen diversas citocinas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor β de crecimiento transformante (TGF- β). En los últimos años, la producción y secreción de citocinas se informan como funciones importantes de las MSC, y se ha demostrado una amplia variedad de actividades farmacéuticas de MSC, en particular, biología de la piel (Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P., Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor and type I collagen; and wound healing, *J Pharmacol Sci*. 2009 Apr; 109(4): 525-531; Miura et al., SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2003) Vol. 100, 5807-5812; Safavi SM, Kazemi B, Esmaili M, Fallah A, Modarresi A, Mir M., Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingiva, *Lasers Med Sci*. 2008 Jul; 23(3): 331-335; Saygun I, Karacay S, Serdar M, Ural AU, Sencimen M, Kurtis B, Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts, *Lasers Med Sci*. 2008 Apr; 23(2): 211-215). Por ejemplo, se informó que las MSC tienen efectos de curación de la piel a través de la producción de diversos factores de crecimiento (véase, Minoru Ueda, The Use of fibroblasts, *The Biochemical Society*, 11-15, 2007). Estos factores de crecimiento activados HDF, mejoraron el crecimiento/migración de HDF y la secreción de colágeno mediada por HDF. Dado que los factores de secreción de las MSC se indicaron para proteger la HDF del estrés por oxidación, también se demostró el efecto antioxidante de las MSC. La aplicación de factores de crecimiento tópicos dio como resultado la estimulación de la reparación del fotoenvejecimiento de la cara, y proporcionó una apariencia clínica más suave de la piel con síntesis de *novus* de colágeno, disminución del engrosamiento del epitelio y una reducción de las arrugas visualmente notables (He H, Yu J, Liu Y, et al., Effects of FGF2 and TGF β 1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro, *Cell Biol Int* 2008; 32: 827-834; Robey PG., Stem cells near the century mark, *J Clin Invest* 2000; 105: 1489-1491).

Resumen de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Problema a ser resuelto por la invención

Sin embargo, aún no está claro cómo se pueden aplicar médicamente las células madre de la pulpa dental, como SHED o DPSC, y las enfermedades diana específicas de las mismas no se conocen en absoluto.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo medio terapéutico que utiliza células madre de pulpa dental.

Medios para resolver el problema

La presente divulgación que comprende la invención se refiere a los siguientes aspectos:

- [1] Una composición de tratamiento de parte dañada para uso en el tratamiento de daño a la piel, tejido periodontal o hueso, tratamiento de infarto cerebral o tratamiento de un daño de la medula espinal, la composición comprende un medio acondicionado con célula madre obtenido al cultivar células madre de pulpa dental, en donde la composición no incluye células madre.
- 5 [2] La composición de tratamiento de parte dañada según [1], en la que el medio acondicionado con células madre incluye al menos dos citocinas.
- 10 [3] La composición de tratamiento de parte dañada según cualquiera de [1] a [2], en la que el medio acondicionado con células madre incluye al menos dos citocinas seleccionadas del grupo que consiste en factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor β de crecimiento transformante (TGF- β).
- 15 [4] La composición de tratamiento de parte dañada de acuerdo con una cualquiera de [1] a [7], que no incluye ningún suero.
- [5] Un método para producir la composición de tratamiento de la parte dañada de cualquiera de [1] a [4], el método incluye los siguientes pasos (1) a (4):
- 20 (1) un paso de seleccionar células adhesivas de células de pulpa dental;
- (2) un paso de cultivar las células adhesivas;
- (3) un paso de eliminar los componentes celulares por separación después de cultivar; y
- 25 (4) un paso de recolectar un medio condicionado.
- [6] El método de producción de acuerdo con [5], que incluye además el siguiente paso (5):
- 30 (5) un paso de someter el medio acondicionado recolectado a al menos un tratamiento seleccionado del grupo que consiste de centrifugación, concentración, sustitución de solventes, diálisis, congelación, secado, liofilización, dilución, desalinización y almacenamiento.
- [7] El método de producción de acuerdo con [4] o [6], además incluye uno de los siguientes pasos (a) o (b):
- 35 (a) un paso de verificar el medio acondicionado recolectado con respecto a la presencia o ausencia de una actividad de excrecencia de neuritas en presencia
- de una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa; o
- 40 (b) un paso de verificar el medio acondicionado recolectado con respecto a la presencia o ausencia de una actividad inhibidora de la apoptosis hacia células neuronales.
- [8] Un método para determinar si un medio acondicionado con célula madre de la pulpa dental preparado es eficaz como ingrediente activo de la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC el método que incluye al menos uno de los siguientes pasos (a) o (b):
- 45 (a) un paso de verificar el medio acondicionado con respecto a la presencia o ausencia de una actividad excrecencia de neuritas en presencia de una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa; o
- 50 (b) un paso para verificar el medio acondicionado con respecto a la presencia o ausencia de una actividad inhibidora de apoptosis hacia las células neuronales
- Efecto ventajoso de la invención
- 55 Según la invención, un nuevo tratamiento significa utilizar una célula madre de pulpa dental, específicamente una composición de tratamiento de parte dañada y un método de producción de la misma, y puede proporcionarse un método de tratamiento de parte dañada que usa la composición de tratamiento de parte dañada.
- 60 Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 es un diagrama que ilustra un diseño experimental usando ratones sin pelo. La arruga fue inducida por la irradiación UVB.
- 65 La Fig. 2 es una vista que muestra la morfología, el análisis inmunológico y las tasas de proliferación de diversos tipos de células. (A) a (C) representan respectivamente (A) BMSC, (B) DPSC y (C) SHED (x 40). (D) a (F) representan imágenes

de tinción de inmunofluorescencia del marcador de células madre STRO-1. (D) BMSC, (E) DPSC y (F) SHED fueron positivos para STRO-1 (fluorescencia verde). DAPI se utilizó para visualizar los núcleos (fluorescencia azul). (G) Las tasas de proliferación de SHED, DPSC y BMSC se evaluaron usando BrdU. Bar: desviación estándar. Significancia: * $P < 0.05$.

5 La Fig. 3 es una vista que muestra la evaluación de arrugas por análisis de réplica después de la inyección de SH-CM. (A) un grupo a tratar, (B) un grupo tratado con 100% SH-CM.

La Fig. 4 es un diagrama que demuestra la mejora de las arrugas en el nivel natural del grupo inyectado con SH-CM y SHED.

10 La Fig. 5 es una vista que muestra imágenes de tinción de hematoxilina-eosina. (A) grupo tratado con SH-CM. (B) grupo inyectado SHED.

La Fig. 6 es un gráfico que compara los espesores dérmicos.

15 La Fig. 7 es un diagrama que muestra un efecto del SH-CM sobre la proliferación de HDF.

La Fig. 8 muestra un análisis de transferencia Western que demuestra un efecto de SH-CM sobre el colágeno tipo I y MMP-1.

20 La Fig. 9 es un diagrama conceptual que ilustra el mecanismo de regeneración ósea usando la composición de la invención.

La Fig. 10 es un diagrama explicativo que ilustra el método experimental según el Ejemplo 3 de la invención.

25 La Fig. 11 es una vista que explica el cálculo del valor de BIC empleado en el ejemplo 3 de la invención.

La Fig. 12 muestra imágenes de tinción obtenidas como resultado del Ejemplo 3 de la invención.

30 La Fig. 13 es un diagrama que muestra los resultados del Ejemplo 3 de la invención.

La Fig. 14 es una fotografía que demuestra los resultados del Ejemplo 3 de la invención.

35 La Fig. 15 es una fotografía de rayos X que muestra los resultados del caso clínico del Ejemplo 3 de la invención.

La fig. 16 es una vista que explica el modelo experimental del ejemplo 4 de la invención.

La Fig. 17 es una fotografía que explica las modalidades de tratamiento empleadas en el Ejemplo 4 de la invención.

40 La Fig. 18 es una fotografía que explica las modalidades de tratamiento empleadas en el Ejemplo 4 de la invención.

La Fig. 19 es un diagrama que explica las modalidades de tratamiento empleadas en el Ejemplo 4 de la invención.

45 La Fig. 20 muestra imágenes de tinción que muestran el estado de regeneración del cemento obtenido como resultado del Ejemplo 4 de la invención. Las fotografías superiores muestran el caso de usar GF, y las fotografías inferiores muestran el caso de usar PRP.

La Fig. 21 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 4 de la invención (N_2 -CN).

50 La Fig. 22 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 4 de la invención (N_1 -JE).

La Fig. 23 es una fotografía que muestra el pretratamiento en el caso clínico del Ejemplo 4 de la invención.

55 La fig. 24 es una fotografía que explica la forma de tratamiento en el caso clínico del ejemplo 4 de la invención.

La Fig. 25 es una fotografía que muestra los resultados del caso clínico del Ejemplo 4 de la invención.

La Fig. 26 es un diagrama que ilustra la inducción de infarto cerebral de acuerdo con el Ejemplo 5 de la invención.

60 La Fig. 27 es un gráfico que muestra los cambios en el puntaje de discapacidad después de comenzar la administración nasal al Grupo I, Grupo II y Grupo III en el Ejemplo 5 de la invención.

La Fig. 28 es un gráfico que muestra los volúmenes de infarto en el día 16 después de comenzar la administración nasal al Grupo I, Grupo II y Grupo III en el Ejemplo 5 de la invención.

65

La Fig. 29 es un diagrama conceptual que explica un método de preparación del medio acondicionado. hSHED: célula madre de dientes deciduos exfoliados humanos. hDPSC: célula madre de la pulpa dental de los dientes permanentes. hBMSC: célula madre mesenquimal de médula ósea humana. hFibroblastos: fibroblasto humano.

5 La Fig. 30 es una fotografía que muestra los resultados de un experimento de excreción de neurita (imagen microscópica de contraste de fase).

La Fig. 31 muestra los resultados de un experimento de excreción de neurita. El gráfico muestra la proporción de células de neuritas observadas (izquierda) y longitud de neuritas (derecha).

10 La Fig. 32 es una fotografía que muestra los resultados de un experimento de excreción de neurita (imagen microscópica de contraste de fase).

15 La Fig. 33 muestra el resultado de un experimento de excreción de neurita. El gráfico muestra la proporción de células de neuritas observadas (izquierda) y longitud de neuritas (derecha).

La Fig. 34 es una fotografía que muestra los resultados de un experimento de inhibición de apoptosis (ensayo TUNEL).

20 La Fig. 35 muestra el resultado de un experimento de inhibición de apoptosis (ensayo TUNEL). El gráfico muestra los efectos inhibidores de la apoptosis procesados estadísticamente del medio acondicionado a partir de las células madre de la pulpa dental. El gráfico de la izquierda es un gráfico en el que se comprueban los efectos inhibidores de la apoptosis en presencia de CSPG, y el gráfico de la derecha es un gráfico en el que se comprueban los efectos inhibidores de la apoptosis en presencia de MAG.

25 La Fig. 36 es un gráfico que muestra los resultados de un experimento que usa un modelo animal de lesión por aplastamiento de la médula espinal. SHED-CM: grupo administrado con medio acondicionado de células madre de pulpa dental. BMSC-CM: grupo administrado con medio acondicionado de células madre mesenquimales de médula ósea. Control: grupo administrado por PBS.

30 La Fig. 37 muestra los resultados de un experimento que usa un modelo animal de lesión por aplastamiento de la médula espinal. La comparación entre el grupo control y el grupo SHED-CM se muestra en términos del estado de la médula ósea (fotografía superior) y el peso de la médula espinal (gráfico inferior).

35 La fig. 38 muestra los resultados de un experimento que usa un modelo animal de lesión por aplastamiento de la médula espinal. SHED-CM: grupo administrado con medio acondicionado con células madre de pulpa dental. Control: grupo administrado por PBS.

40 La Fig. 39 muestra los resultados de un experimento que usa un modelo animal de lesión por aplastamiento de la médula espinal. SHED-CM: grupo administrado con medio acondicionado con células madre de pulpa dental. Control: grupo administrado por PBS.

Mejor realización para llevar a cabo la invención

Composición de tratamiento de parte dañada

45 La composición de tratamiento de parte dañada de la invención es una composición de tratamiento de parte dañada para usar en el tratamiento de una parte dañada de un tejido diana, la composición incluye un medio acondicionado con células madre obtenido cultivando células madre de pulpa dental.

50 Como se divulga en este documento, el método de tratamiento de la parte dañada es un método de tratamiento de parte dañada para reparar o restaurar una parte dañada de un tejido diana, el método incluye la administración de la composición de tratamiento de la parte dañada a un paciente que tiene el tejido diana para la composición de tratamiento de partes dañada, en una cantidad efectiva para reparar la parte dañada del tejido diana

55 Cuando la aplicación de SHED a la cicatrización de heridas todavía era una inferencia, los inventores de la invención estudiaron la relación entre un factor de crecimiento derivado de células madre de dientes deciduos exfoliados humanos (SHED) y fibroblastos dérmicos humanos (HDF) en la primera vez. SHED afecta a los HDF al mejorar la síntesis de colágeno y activar el crecimiento y la actividad de migración de los HDF. Esto sugiere que el SHED o el medio acondicionado derivado de SHED (SH-CM) se puede usar para el tratamiento del fotoenvejecimiento. Los resultados sugieren que SHED y SH-CM deberían ser estructuralmente adecuados para el tratamiento del fotoenvejecimiento. SHED contribuye a la mejora de la actividad de curación de heridas de HDF, principalmente con un factor de crecimiento secretado o proteína de matriz extracelular. Un estudio adicional del mecanismo que utiliza anticuerpos neutralizantes contra los factores de crecimiento respectivos aclara las funciones de los factores solubles de SHED en el proceso de curación de heridas. Además, los dientes deciduos se exfolian naturalmente durante la infancia y generalmente se eliminan tal como están. Por lo tanto, la utilización de células madre de dientes deciduos exfoliados humanos tiene una

gran ventaja en términos de la ausencia de invasividad de la obtención de los mismos y del problema de moralidad para su utilización.

Según la invención, se usa un medio acondicionado con células madre obtenido cultivando células madre como ingrediente activo para una composición de tratamiento de partes dañada. Cuando el medio acondicionado con células madre, que contiene una mezcla de citocinas, se aplica a una parte dañada, el medio acondicionado con células madre induce el crecimiento celular en la parte dañada, como resultado de lo cual se puede reparar el tejido que tiene la parte dañada. En una realización de la invención, se puede suponer que la mezcla de citocinas en el medio acondicionado con células madre utilizado en la invención sirve como una señal inductiva para células madre endógenas en el tejido diana, y, por lo tanto, las células madre endógenas pueden diferenciarse y proliferar. Como resultado, la proliferación de células, la generación de matriz extracelular, etc. puede ocurrir en la parte dañada del tejido diana. A partir de estos, se cree que un tejido que tiene una parte dañada se puede reparar basándose en dicha capacidad regenerativa de células madre endógenas en el tejido diana.

Por ejemplo, la secreción de varios factores de crecimiento implicados en la regeneración de la piel a partir de MSC permite que el SHED y el factor de crecimiento derivado de SHED reviertan el fotodaño inducido por UVB. Por lo tanto, se indujeron arrugas en ratones sin pelo mediante un régimen de irradiación UVB de ocho semanas, y se investigó un efecto antiarrugas mediante la inyección subcutánea de SHED y su medio acondicionado. Además, se investigaron los mecanismos para mejorar las arrugas a través de rutas paracrinas mediante el uso adicional de SH-CM en HDF cultivadas.

En la invención, el término "parte dañada" significa una parte en un tejido que se volvió incapaz de realizar su función original debido a la aparición de un defecto físico o fisiológico en el tejido, y el concepto del mismo abarca una lesión externa así como una parte lesionada, una parte disfuncional o una parte enferma causada por un defecto físico o fisiológico del tejido.

En la invención, "reparación" significa que algunas o todas las funciones que se perdieron debido al daño al tejido diana se mantienen o se recuperan en comparación con las funciones de la parte dañada en el momento del daño, y abarca en términos generales la recuperación de las funciones del tejido, así como la regeneración como un tejido funcional. La evaluación para el mantenimiento o la recuperación de las funciones se puede llevar a cabo basándose, por ejemplo, en un ensayo generalmente empleado para la evaluación del aspecto y el grado de la función de interés, aunque la evaluación varía según el tejido dañado.

Los ejemplos de células madre somáticas utilizadas en la invención incluyen, pero no se limitan a, células madre del sistema dérmico, el sistema digestivo, el sistema de la médula ósea, el sistema nervioso, etc. Los ejemplos de las células madre somáticas en el sistema dérmico incluyen las células madre epidérmicas, las células madre del folículo piloso, etc. Los ejemplos de las células somáticas en el sistema digestivo incluyen células madre pancreáticas (comunes), células madre hepáticas, etc. Los ejemplos de las células somáticas en el sistema de la médula ósea incluyen células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, etc. Los ejemplos de células madre somáticas en el sistema nervioso incluyen células madre neurales, células madre retinianas, etc. Las células somáticas usadas en la invención pueden ser de origen natural o genéticamente modificadas siempre que puedan alcanzar el tratamiento deseado.

Los orígenes de las células madre se clasifican en ectodermo, endodermo y mesodermo. Las células madre de origen ectodérmico están presentes principalmente en el cerebro e incluyen células madre neurales. Las células madre de origen endodérmico están presentes principalmente en la médula ósea, e incluyen células madre de los vasos sanguíneos, células madre hematopoyéticas, células madre mesenquimales, etc. Las células madre de origen mesodérmico están presentes principalmente en los órganos, e incluyen células madre hepáticas, células madre pancreáticas, etc.

En la invención, es preferible usar células madre somáticas que pueden derivarse de cualquier mesénquima, más preferiblemente células madre somáticas derivadas de pulpa dental, y más preferiblemente células madre somáticas derivadas de dientes deciduos exfoliados humanos. Las células madre somáticas de la mesénquima pueden producir diversas citocinas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento hepatocítico (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor β de crecimiento transformante (TGF- β) -1 y -3, TGF- α , KGF, HBEGF y SPARC. En la invención, el medio acondicionado con células madre incluye preferiblemente al menos dos citocinas, y más preferiblemente incluye una combinación de dos o más seleccionados del grupo que consiste en factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor β de crecimiento transformante (TGF- β).

La mezcla de citocinas para usar en la invención se puede usar como una parte del medio acondicionado con células madre o como una mezcla de citocinas que se ha aislado del medio acondicionado con células madre. En la mezcla de citocinas aisladas del medio acondicionado con células madre, una parte de las citocinas puede reemplazarse con una o más citocinas conocidas correspondientes.

El medio acondicionado con células madre para uso en la invención se obtiene preferiblemente a partir de un cultivo de células madre somáticas derivadas del mismo individuo que tiene el tejido diana, para evitar el rechazo. El tejido diana

puede ser el mismo o diferente de un tejido a partir del cual se deriva la célula madre somática utilizada para obtener el medio acondicionado con células madre.

Un medio acondicionado con células madre utilizado en la invención no se limita a un medio acondicionado con células madre obtenido del cultivo de células madre somáticas, y puede contener un medio acondicionado con células madre obtenido del cultivo de células madre embrionarias (células ES), células madre pluripotentes inducidas (células iPS), células de carcinoma embrionario (células EC) o similares.

El medio acondicionado con células madre somáticas es un medio obtenido cultivando células madre somáticas, y no incluye las células mismas. El medio acondicionado que se puede usar en la invención se puede obtener, por ejemplo, eliminando los componentes celulares por separación después del cultivo. El medio acondicionado puede someterse a diversos tratamientos (tales como centrifugación, concentración, sustitución de disolventes, diálisis, congelación, secado, liofilización, dilución, desalinización o almacenamiento), según corresponda, antes de su uso.

Las células madre para obtener el medio acondicionado con células madre se pueden seleccionar mediante un método ordinario, y se pueden seleccionar en función del tamaño y la morfología de las células, o como células adhesivas. En el caso de células madre de pulpa dental, las células madre pueden seleccionarse como células adhesivas de células de pulpa dental obtenidas de dientes deciduos exfoliados o dientes permanentes, o como células subcultivadas de los mismos, como se describe a continuación. El método descrito más adelante para producir una composición de tratamiento de enfermedades del SNC se puede usar preferiblemente como un método para producir la composición de tratamiento de partes dañadas. El medio acondicionado para células madre de pulpa dental que se utilizará puede ser un medio acondicionado obtenido cultivando las células madre seleccionadas. En el caso de utilizar otras células madre, el medio acondicionado con células madre se puede obtener después de obtener células madre diana de un tejido que puede contener las células madre diana de una manera similar.

El “medio acondicionado con células madre” se define como un medio que se obtiene cultivando células madre, y que no incluye las células mismas. La composición de la invención incluye el “medio acondicionado con células madre” como ingrediente activo. En un aspecto de la composición, la composición como un todo no incluye ninguna célula (independientemente del tipo de células). La composición de acuerdo con este aspecto se distingue claramente de las propias células madre como una cuestión de rutina, y de diversas composiciones que contienen células madre, debido a la característica descrita anteriormente. Un ejemplo típico de este aspecto es una composición que no incluye ninguna célula madre, y que consiste únicamente en el medio acondicionado con células madre.

Un medio basal, o un medio obtenido añadiendo suero o similar a un medio basal, se puede usar para el medio de cultivo de células madre. En el caso de preparar un “medio acondicionado de células madre de pulpa dental” libre de suero, es preferible usar un medio libre de suero durante todo el proceso o usar un medio libre de suero en el subcultivo para el último pasaje, o para los últimos pocos pasajes. El DMEM, el medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) (GIBCO Corporation, etc.), el medio F12 de Ham (HamF12) (Sigma-Aldrich Corporation, GIBCO Corporation, etc.), el medio RPMI1640, etc., se pueden usar como medio basal. Se pueden usar dos o más medios basales en combinación. Un ejemplo de un medio mixto es un medio formado mezclando cantidades equivalentes de IMDM y HamF12 (disponible comercialmente como, por ejemplo, IMDM/HamF12 (nombre comercial, GIBCO Corporation)). Los ejemplos de ingredientes que se pueden agregar al medio incluyen sueros (tales como suero bovino fetal, suero humano y suero de oveja), sustitutos del suero (reemplazo sérico “knockout” (KSR), etc.), albúmina de suero bovino (BSA), antibióticos, diversas vitaminas y diversos minerales.

Para el cultivo de células madre, las condiciones usuales pueden aplicarse tal como están. El método para producir un medio acondicionado con células madre puede ser el mismo que el método descrito más adelante para producir una composición de tratamiento de enfermedades del SNC, excepto para modificar apropiadamente el paso de aislamiento y selección de células madre de acuerdo con el tipo de células madre. Estos expertos en la técnica podrían llevar a cabo de manera apropiada el aislamiento y la selección de las células madre de acuerdo con el tipo de células madre.

Ejemplos del tejido diana en la invención incluyen piel, hueso, tejido periodontal, cerebro, etc. La composición de la invención es efectiva para reparar tales tejidos diana. Como ejemplo, la Fig. 9 muestra un diagrama conceptual del mecanismo de regeneración ósea usando la composición de la invención.

La composición de la invención también es efectiva para el tratamiento de trastornos relacionados con el daño tisular. Ejemplos de tales trastornos incluyen infarto cerebral, enfermedad periodontal, lesión de la médula espinal, ulceración de la piel, osteoporosis, etc. En otras palabras, la composición de la invención es una composición para el tratamiento de infarto cerebral, enfermedad periodontal, lesión de la médula espinal, ulceración de la piel, osteoporosis, etc., e incluye un medio acondicionado con células madre obtenido cultivando células madre somáticas. Por ejemplo, la composición de tratamiento de parte dañada de la invención se usa como una composición para el tratamiento del daño a la piel, tal como el tratamiento de un daño a la piel, tejido periodontal o hueso, tratamiento de infarto cerebral o tratamiento de un daño a la médula espinal. La dosificación de la composición de tratamiento de parte dañada puede ser cualquier cantidad terapéuticamente efectiva. Cuando la composición de tratamiento de la parte dañada, que incluye el medio acondicionado con células madre como ingrediente activo, se usa para el tratamiento, la dosificación de la composición de tratamiento

de la parte dañada se puede ajustar, según sea apropiado. La composición de tratamiento de parte dañada se puede usar después de concentrar el ingrediente activo como se describe a continuación.

5 Se pueden usar adicionalmente otros ingredientes en la composición de la invención de acuerdo con el estado del sujeto al que se aplica la composición, siempre que se mantenga el efecto terapéutico esperado. Algunos ejemplos de ingredientes que se pueden usar adicionalmente en la invención incluyen los siguientes:

(i) Materiales bioabsorbibles

10 Ácido hialurónico, colágeno, fibrinógeno (por ejemplo, BOLHEAL (marca registrada)), etc., se pueden usar como materiales bioabsorbibles orgánicos.

(ii) Materiales gelificantes

15 Los materiales gelificantes para uso tienen preferiblemente alta bioafinidad, y se pueden usar ácido hialurónico, colágeno, adhesivo de fibrina o similares. Se pueden seleccionar y usar diversos ácidos hialurónicos y colágenos, y es preferible adoptar los adecuados para el propósito de la aplicación de la composición de la invención (el tejido al que se aplicará la composición). Los colágenos a usar son preferiblemente solubles (colágenos solubles en ácidos, colágenos solubles en álcalis, colágenos solubilizados en enzimas, etc.).

20 (iii) Otros

Otros ingredientes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, vehículos, excipientes, desintegrantes, agentes tampón, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes calmantes, estabilizadores, conservantes, agentes antisépticos, solución salina fisiológica, etc.) pueden estar contenidos. Lactosa, almidón, sorbitol, D-manitol, azúcar blanco, etc. se pueden usar como excipientes. Se pueden usar almidón, carboximetilcelulosa, carbonato de calcio, etc. como disgregantes. Las sales de ácido fosfórico, sales de ácido cítrico, sales de ácido acético, etc. pueden usarse como agentes tamponantes. La goma arábiga, el alginato de sodio, tragacanto, etc. pueden usarse como agentes emulsionantes. Se pueden usar monoestearato de glicerina, monoestearato de aluminio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, lauril sulfato de sodio, etc. como agentes de suspensión. Se pueden usar alcohol bencílico, clorobutanol, sorbitol, etc. como agentes calmantes. El propilenglicol, el ácido ascórbico, etc. pueden usarse como estabilizantes. El fenol, el cloruro de benzalconio, el alcohol bencílico, el clorobutanol, el metilparabeno, etc. pueden usarse como conservantes. El cloruro de benzalconio, el ácido parahidroxibenzoico, el clorobutanol, etc. pueden usarse como agentes antisépticos. También se pueden contener antibióticos, agentes de ajuste del pH, factores de crecimiento (como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), etc.

La forma final de la composición de la invención no está particularmente limitada. Los ejemplos de la forma incluyen formas líquidas (tales como una forma puramente líquida y una forma de gel) y formas sólidas (tales como una forma pulverulenta, una forma de grano fino y una forma granular).

También se divulga aquí un método para reparar una parte dañada de un tejido diana y un método para tratar un tejido dañado. Estos métodos incluyen administrar el medio acondicionado con células madre a la parte dañada del tejido diana o al tejido dañado. Debido a la administración, el tejido diana que tiene la parte dañada se puede reparar efectivamente. En particular, en un caso en el que el tejido diana es el cerebro, los métodos se pueden aplicar preferiblemente como un método para tratar el infarto cerebral.

El método y la ruta de administración de la composición de tratamiento de partes dañadas no están particularmente limitados. Por ejemplo, la composición de tratamiento de parte dañada se administra preferiblemente por vía parenteral, y la administración parenteral puede ser administración sistémica o administración tópica. Los ejemplos de administración tópica incluyen inyección, aplicación o pulverización en el tejido diana, etc. Los ejemplos del método de administración de la composición de tratamiento de parte dañada incluyen administración intravenosa, administración intraarterial, administración intraportal, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intraperitoneal, administración intranasal, etc. En particular, es preferible la administración intranasal o similar debido a su baja invasividad. El régimen de dosificación puede ser, por ejemplo, de una a varias veces al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días o similar. El régimen de dosificación puede prepararse teniendo en cuenta el sexo, la edad, el peso, el estado patológico, etc. del sujeto (receptor).

La selección del método de administración puede ser llevada a cabo por un experto en la técnica, en función del tipo de tejido diana, el tipo de enfermedad a tratar, etc. Por ejemplo, la aplicación de la administración intranasal o similar se puede utilizar para, por ejemplo, el tratamiento de un trastorno o reparación de un tejido dañado cuyo tejido diana se localiza en el cerebro, debido a que la administración intranasal es menos invasiva y está libre de la necesidad de considerar el paso a través de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, la administración intranasal se puede aplicar en un caso en el que el tejido diana es cerebro. La administración intranasal se puede aplicar al tratamiento del infarto cerebral.

El sujeto al que se administra la composición de tratamiento de la parte dañada es típicamente un paciente humano que tiene daño en el tejido diana. Sin embargo, la aplicación a mamíferos que no sean humanos (incluidos animales de compañía, animales de granja y animales de laboratorio, cuyos ejemplos específicos incluyen ratones, ratas, conejillos de indias, hámsters, monos, ganado, cerdos, cabras, ovejas, perros, gatos, etc.) también está contemplado.

Como se divulgó aquí, el método para tratar el infarto cerebral de la invención incluye administrar por vía intranasal el medio acondicionado con células madre, para reparar una parte dañada del cerebro. De acuerdo con este método de tratamiento, una región que fue dañada por un infarto cerebral puede restaurarse efectivamente con menos invasividad.

<Composición de tratamiento de la enfermedad del SNC>

También se divulga aquí, una composición de tratamiento de la enfermedad del SNC y un método para tratar una enfermedad del SNC.

Los inventores llevaron a cabo investigaciones bajo las circunstancias discutidas anteriormente. Los inventores han aclarado que las células madre de la pulpa dental son un grupo único de células que coexpresan todos los marcadores del linaje neural incluyendo marcadores de células madre neurales, marcadores de células neurales diferenciadas, marcadores de astrocitos y marcadores de oligodendrocitos, y que las células madre de la pulpa dental expresan altamente el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y también han demostrado, a través de experimentos con animales, que las células madre de la pulpa dental inducen la regeneración del nervio (véase la Solicitud de Patente Japonesa No. 2010-92585).

Como se describió anteriormente, los inventores hasta ahora buscaron la capacidad potencial de las células madre de la pulpa dental (SHED, DPSC), y estudiaron la utilidad de las mismas como células desde varios puntos de vista. Durante la rutina del avance de la investigación, los inventores han cambiado drásticamente su punto de vista y han llevado a cabo diversos experimentos centrados en un medio acondicionado de células madre de pulpa dental. Aquí, existe un hecho ya conocido de que los nervios periféricos se regeneran fácilmente después de ser dañados, pero los nervios centrales (cerebro, médula espinal) rara vez se regeneran. La razón más grande por la cual no se produce la regeneración del nervio central es la presencia de varios factores que inhiben la excrecencia de los axones regenerados en el SNC después de ser dañados. El proteoglicano de condroitín sulfato derivado de astrocitos (CSPG) activado, la glicoproteína asociada a mielina (MAG), etc., hasta ahora se han identificado como factores inhibidores de la regeneración nerviosa. Estas sustancias inhibitoras inhiben la excrecencia del axón neuronal a través de la activación de la proteína intracelular Rho o ROCK e inducen apoptosis. No se ha encontrado ningún agente que inhiba la apoptosis incluso en presencia de un factor inhibidor de la regeneración nerviosa, y que ejerce un efecto de elongación del axón. El análisis de los inventores reveló un hecho sorprendente que un medio acondicionado con células madre de pulpa dental inhibe la acción de sustancias inhibitoras de la regeneración nerviosa (cancela la inhibición), promueve la excrecencia de neuritas y suprime la apoptosis incluso en el entorno de un SNC dañado (es decir, el entorno en el que están presentes las sustancias que inhiben la excrecencia de neuritas e inducen apoptosis). Los inventores estudiaron además la actividad del medio acondicionado con células madre de pulpa dental utilizando animales modelo con médula espinal lesionada, como resultado de lo cual la administración del medio acondicionado con células madre de pulpa dental mejoró notablemente la función motora de las extremidades posteriores. Además, como resultado de la evaluación histológica, la administración del medio acondicionado con células madre de pulpa dental suprimió la alteración morfológica de la médula espinal y la ampliación de la lesión nerviosa. Como se discutió anteriormente, también se confirmaron los excelentes efectos regenerativos y terapéuticos del medio acondicionado con células madre de la pulpa dental mediante experimentos con animales.

Como se describió anteriormente, el estudio exhaustivo realizado por los inventores de la invención dio como resultado el hallazgo de que el medio acondicionado con células madre de la pulpa dental es bastante eficaz para la regeneración y la curación del SNC. La invención, tal como se analiza a continuación, se basa principalmente en este hallazgo. Aquí, el medio acondicionado con células madre de pulpa dental es más ventajoso que un caso en el que se utilizan células madre de pulpa dental, en términos de preparación y almacenamiento avanzados, y el medio acondicionado de células madre de pulpa dental es particularmente adecuado para el tratamiento de la fase aguda o subaguda de las enfermedades del SNC. La utilidad del medio acondicionado con células madre de la pulpa dental es bastante alta también en el sentido de que el medio acondicionado con células madre de la pulpa dental no incluye ningún componente celular y es capaz de superar el problema del rechazo inmunitario.

La presente divulgación incluye lo siguiente:

[1] Una composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC que incluye un medio acondicionado con células madre de pulpa dental.

[2] La composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC de acuerdo con [1], que exhibe una actividad de excrecencia de neuritas en presencia de una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa.

[3] La composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC según [2], en la que la sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa es el proteoglicano sulfato de condroitina o la glicoproteína asociada a la mielina.

- [4] La composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], que exhibe una actividad inhibidora de la apoptosis hacia las células neuronales.
- 5 [5] La composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC según cualquiera de [1] a [4], que no incluye ninguna célula madre de pulpa dental.
- [6] La composición de tratamiento de la enfermedad del SNC según cualquiera de [1] a [4], que se combina con células madre de pulpa dental.
- 10 [7] La composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC de acuerdo con [6], en la que las células madre de la pulpa dental son células madre de la pulpa dental indiferenciadas que no se han sometido a un tratamiento inductor de la diferenciación después de su obtención.
- 15 [8] La composición de tratamiento de la enfermedad del SNC según cualquiera de [1] a [7], que no incluye suero.
- [9] La composición de tratamiento de enfermedades del SNC de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], en la que el medio acondicionado es un medio acondicionado obtenido cultivando células adhesivas en células de pulpa dental o células subcultivadas de las mismas.
- 20 [10] La composición de tratamiento de la enfermedad del SNC según cualquiera de [1] a [9], en la que la enfermedad del SNC es una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en enfermedades neurodegenerativas tales como lesión de la médula espinal, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Huntington, atrofia multisistémica y ataxia espinocerebelosa, degeneración o pérdida de células neuronales causada por isquemia cerebral, hemorragia intracerebral o infarto cerebral
- 25 y una enfermedad retiniana que involucra un trastorno de células neuronales.
- [11] Un método para producir una composición de tratamiento de enfermedades del SNC que incluye los siguientes pasos (1) a (3):
- 30 (1) un paso de seleccionar células adhesivas de células de pulpa dental;
- (2) un paso de cultivar las células adhesivas; y
- (3) un paso de recolectar un medio acondicionado.
- 35 [12] El método de producción de acuerdo con [11], en el que el paso (2) se lleva a cabo usando un medio sin suero.
- [13] El método de producción de acuerdo con [11] o [12], en el que el medio acondicionado después del subcultivo se recoge en el paso (3).
- 40 [14] El método de producción de acuerdo con cualquiera de [11] a [13], que incluye además el siguiente paso (4):
- (4) un paso de someter el medio acondicionado recogido a al menos un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en centrifugación, concentración, sustitución de solventes, diálisis, congelación, secado, liofilización, dilución, desalinización y almacenamiento.
- 45 [15] El método de producción de acuerdo con cualquiera de [11] a [14], que incluye además el siguiente paso (a) y/o (b):
- (a) un paso de verificar el medio acondicionado recolectado con respecto a la presencia o ausencia de una actividad de excrecencia de neuritas en presencia de una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa; y
- 50 (b) un paso de verificación del medio acondicionado recolectado con respecto a la presencia o ausencia de una actividad inhibidora de la apoptosis hacia las células neuronales.
- [16] El método de producción según cualquiera de [11] a [15], en el que la enfermedad del SNC es una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en lesión de la médula espinal, enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Huntington, atrofia sistémica múltiple y ataxia espinocerebelosa, degeneración o pérdida de células neuronales causadas por isquemia cerebral, hemorragia intracerebral o infarto cerebral y una enfermedad retiniana que involucra un trastorno de células neuronales.
- 55 [17] La composición de tratamiento para el uso en un método para tratar una enfermedad del SNC que incluye un paso de administración de la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC de cualquiera de [1] a [10] a un paciente con enfermedad del SNC, en una cantidad terapéuticamente efectiva.
- 60

[18] La composición de tratamiento para el uso de acuerdo con [17], en el que una célula madre de pulpa dental se administra al paciente con enfermedad del SNC simultáneamente con, o después de, la administración de la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC.

5 [19] La composición de tratamiento para el uso según [18], en el que la célula madre de pulpa dental es una célula madre de pulpa dental indiferenciada que no ha sido sometida a tratamiento inductor de diferenciación después de su obtención, o una célula madre de pulpa dental inducida por diferenciación que ha sido inducida a diferenciarse en una célula neuronal después de su obtención.

10 [20] La composición de tratamiento para el uso de acuerdo con [17], en el que una célula madre pluripotente que ha sido inducida para diferenciarse en una célula neuronal se administra al paciente con enfermedad del SNC después de la administración de la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC.

15 [21] Un método in vitro para determinar si un medio acondicionado de células madre de pulpa dental preparado es o no eficaz como un ingrediente activo de la composición de tratamiento de enfermedades del SNC, comprendiendo el método el siguiente paso (a) y/o (b):

(a) un paso de verificar el medio acondicionado con respecto a la presencia o ausencia de una actividad de excrecencia de neurita en presencia de una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa; y

20 (b) un paso de verificación del medio acondicionado con respecto a la presencia o ausencia de una actividad inhibidora de la apoptosis hacia las células neuronales.

25 Como se discute aquí, la composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC de la invención incluye un medio acondicionado para células madre de pulpa dental. Las células madre de pulpa dental se clasifican en células madre de pulpa dental de dos tipos de células madre de pulpa dental de dientes deciduos y células madre de pulpa dental de dientes permanentes. En la presente especificación, las células madre de la pulpa dental de los dientes deciduos se abrevian como SHED, y las células madre de la pulpa dental de los dientes permanentes se abrevian a DPSC, de acuerdo con las prácticas habituales. Cada uno de un medio acondicionado con SHED y un medio acondicionado con DPSC se puede

30 usar como un medio acondicionado para formar la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC.

La composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC se puede caracterizar por la característica “que exhibe una actividad de excrecencia de neuritas en presencia de sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa”.

35 A diferencia del sistema nervioso periférico, las sustancias inhibidoras de la regeneración nerviosa (factores inhibitorios de excrecencia de neuritas) están presentes en el SNC. Este es un punto importante cuando se planifica la terapia de la enfermedad del SNC (principalmente la regeneración nerviosa), y necesita consideración. El uso de la composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC que tiene la característica descrita anteriormente permite la supresión de la acción de las sustancias inhibidoras de la regeneración nerviosa y la promoción de la regeneración nerviosa. Los ejemplos

40 de las sustancias inhibidoras de la regeneración nerviosa son el proteoglicano condroitinsulfato (CSPG) y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG). Si la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC tiene o no la característica puede confirmarse, por ejemplo, mediante una experimentación in vitro utilizando células neuronales y una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa (CSPG o MAG) (véanse ejemplos descritos más adelante con respecto a los detalles de la experimentación). Se confirma que una composición de prueba tiene la característica descrita anteriormente

45 si se observa excrecencia de neurita cuando las células neuronales se cultivan en la coexistencia de la composición de prueba y CSPG o MAG.

La composición de tratamiento de la enfermedad del SNC se puede caracterizar alternativamente por la característica “que exhibe una actividad inhibidora de la apoptosis hacia las células neuronales”. Si la composición de tratamiento de la

50 enfermedad del SNC tiene o no esta característica puede confirmarse, por ejemplo, mediante una experimentación in vitro usando células neuronales (véanse los ejemplos descritos más adelante con respecto a los detalles de la experimentación). Se confirma que una composición de prueba tiene esta característica si la muerte celular debida a la apoptosis se suprime cuando las células neuronales se cultivan en presencia de la composición de prueba. En un aspecto preferible, la composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC tiene tanto esta característica como la

55 característica descrita anteriormente (que exhibe una actividad de excrecencia de neurita en presencia de una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa).

Como se define aquí, el término “medio condicionado por células madre de pulpa dental” se refiere a un medio que se obtiene cultivando células madre de pulpa dental, y que no incluye componentes celulares (es decir, células de pulpa dental y células madre de pulpa dental). Por lo tanto, un medio acondicionado que se puede usar en la invención se puede

60 obtener, por ejemplo, eliminando los componentes celulares por separación después del cultivo. El medio acondicionado puede someterse a diversos tratamientos (tales como centrifugación, concentración, sustitución de disolventes, diálisis, congelación, secado, liofilización, dilución, desalinización o almacenamiento), según corresponda, antes de su uso. Los detalles de los métodos de tratamiento para el medio acondicionado se describen más adelante.

65

Las células madre de pulpa dental pueden seleccionarse como células adhesivas en células de pulpa dental. Por lo tanto, se puede usar un medio acondicionado obtenido cultivando células adhesivas en células de pulpa dental recogidas de dientes deciduos exfoliados o dientes permanentes, o células subcultivadas de los mismos, como medio acondicionado de células madre de pulpa dental. Los detalles del método de preparación del medio acondicionado a células madre de pulpa dental se describen más adelante.

Como se describió anteriormente, el medio acondicionado a células madre de pulpa dental se define como un medio que se obtiene cultivando células madre de pulpa dental y que no incluye componentes celulares. La composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC incluye el medio acondicionado con células madre de la pulpa dental como ingrediente activo, y, en un aspecto de la misma, la composición como un todo no incluye ninguna célula (independientemente del tipo de células). Como se divulgó aquí, la composición se distingue claramente de las propias células madre de la pulpa dental como una cuestión de rutina, y de diversas composiciones que contienen células madre de pulpa dental, en base a la característica descrita anteriormente. Un ejemplo típico es una composición que consiste únicamente en el medio acondicionado de células madre de pulpa dental.

Como se divulgó aquí, el medio acondicionado a células madre con pulpa dental y las células madre de pulpa dental se usan en combinación. Las células madre de la pulpa dental de los dientes deciduos (SHED) se utilizan en consideración de su mayor capacidad de proliferación celular en comparación con las células madre de la pulpa dental de los dientes permanente (DPSC). Además, se considera que los SHED tienen una mayor capacidad de diferenciación. Un alto nivel de expresión de BDNF de SHED (véase la Solicitud de Patente Japonesa N° 2010-92585), que puede proporcionar efectos terapéuticos más elevados, es otra ventaja del uso de SHED. Además, SHED también tiene una ventaja en que SHED se puede obtener fácilmente.

En los últimos años, muchos grupos de investigación han llevado a cabo investigaciones con el objetivo de realizar la medicina regenerativa usando células. En el caso del uso de células, las células obtenidas de un cuerpo vivo se someten a cultivo, selección, tratamiento o similares, y después se recuperan y se usan como componentes de trasplante. En esta serie de operaciones, un medio acondicionado generalmente se desecha o reemplaza, por ejemplo, con solución salina fisiológica. Por lo tanto, el trasplante final no contiene activamente el medio acondicionado. En vista de esto, incluso la composición de la divulgación descrita anteriormente en la que el medio acondicionado con células madre de pulpa dental y las células madre de pulpa dental se usan en combinación se diferencia literal y prácticamente de composiciones o agentes en los que las células madre de pulpa dental se usan como ingredientes activos con un enfoque en la utilidad de las propias células madre de pulpa dental, basándose en el punto de que la composición de la realización descrita anteriormente incluye el medio acondicionado con células madre de pulpa dental como ingrediente activo esencial.

La divulgación descrita anteriormente se caracteriza por el uso combinado del medio acondicionado con células madre de pulpa dental y las células madre de pulpa dental. La expresión “uso combinado” tal como se usa en el presente documento significa que el medio acondicionado con células madre de pulpa dental y las células madre de pulpa dental se usan juntas. Típicamente, la composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC se proporciona como una preparación de combinación en la que se mezclan el medio acondicionado con células madre de la pulpa dental y las células madre de la pulpa dental. En tal caso, es preferible usar células madre de pulpa dental que no han sido sometidas a inducción de diferenciación después de su obtención (es decir, células madre de pulpa dental que permanecen indiferenciadas, también denominadas “células madre de pulpa dental indiferenciadas”). En este caso, la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC ejerce una fuerte actividad de protección nerviosa y, por lo tanto, es adecuada para la aplicación en la fase aguda o subaguda de enfermedades del SNC (por ejemplo, enfermedades neuronales intratables que implican pérdida grave o degeneración de células neuronales, tales como lesión de la médula espinal o infarto cerebral). Las células madre de pulpa dental usadas pueden ser positivas para el marcador de células madre neurales Nestin, positivas para el marcador de células madre neurales Doublecortin, positivas para el marcador neuronal marcador β -III tubulina, positivas para el marcador neuronal NeuN, positivas para el marcador de astrocitos GFAP, y positivo para el marcador de oligodendrocitos CNPasa, y el BDNF altamente expresado (véase la Solicitud de Patente Japonesa No. 2010-92585).

La composición para el tratamiento de enfermedades del SNC también puede proporcionarse en forma de, por ejemplo, un kit compuesto por un primer elemento constituyente que contiene el medio acondicionado con células madre de pulpa dental y un segundo elemento constituyente que contiene las células madre de pulpa dental.

En este caso, para un sujeto a tratar (normalmente, un paciente con enfermedad del SNC) administrado con el primer elemento constituyente, el segundo elemento constituyente se administra simultáneamente con la administración del primer elemento constituyente o después de la administración del primer elemento constituyente. Un régimen en el que el primer elemento constituyente y el segundo elemento constituyente se administran simultáneamente es particularmente adecuado para la aplicación en la fase aguda o subaguda de enfermedades del SNC. Para que se ejerzan efectos terapéuticos elevados en el caso de la aplicación en la fase aguda o subaguda, es preferible utilizar células madre de pulpa dental indiferenciadas como ingrediente activo del segundo elemento constituyente.

Aquí, el término “simultáneamente” no requiere simultaneidad exacta. Por consiguiente, el concepto de “simultáneamente” abarca un caso en el que ambos elementos se administran sin retardo de tiempo tal como la administración al sujeto después de la mezcla de ambos elementos constituyentes, así como un caso en el que ambos elementos constituyentes

se administran sustancialmente sin retraso de tiempo tal como la administración de uno de los elementos constituyentes inmediatamente después de la administración del otro de los elementos constituyentes.

Según un régimen en el que el primer elemento constituyente se administra en la fase aguda o subaguda, y el segundo elemento constituyente se administra posteriormente (por ejemplo, 3 días a 1 semana después de la administración del primer elemento constituyente), se pueden esperar efectos terapéuticos continuos y completos. En un caso en el que se planifica este régimen, es preferible utilizar células madre de la pulpa dental que se hayan inducido para diferenciarse en células neuronales (también denominadas "células madre de la pulpa dental inducidas por diferenciación") como ingrediente activo del segundo elemento constituyente. Aquí, el alcance del término "células neuronales" abarca neuronas motoras, células productoras de dopamina, diversas células del SNC, astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann. El tipo de células neuronales en el que se deben inducir a diferenciar las células madre de la pulpa dental se puede determinar teniendo en cuenta la enfermedad y el estado patológico del sujeto a tratar. Por ejemplo, para el tratamiento de la lesión de la médula espinal, las células madre de la pulpa dental que se han inducido para diferenciarse en células nerviosas maduras, oligodendrocitos o células de Schwann se pueden usar en el segundo elemento constituyente. Un ejemplo de un método para inducir la diferenciación neuronal se describe a continuación

Un método compuesto por los dos pasos siguientes puede usarse para inducir la diferenciación en células neuronales productoras de dopamina. En el primer paso, las células madre de la pulpa dental se cultivan durante 2 a 3 días en, por ejemplo, un medio DMED que contiene 12.5 U/ml de nistatina, suplemento de N2, 20 ng/ml de bFGF y 20 ng/ml de EGF, usando un plato recubierto con poli-L-lisina. Como resultado de este paso, se induce la diferenciación de células madre neuronales de la célula madre de la pulpa dental. En el segundo paso, las células después del primer paso se cultivan durante 6 a 7 días en, por ejemplo, un medio Neurobasal™ que contiene suplemento B27, db-cAMP 1 mM, IBMX 0.5 mM, ácido ascórbico 200 µM y 50 ng/mL de BDNF. Las células neuronales productoras de dopamina inducidas pueden confirmarse por inmunotinción usando un anticuerpo antitirosina hidroxilasa. Además del método anterior, varios métodos que se han informado como métodos para inducir la diferenciación de células madre neuronales o células madre embrionarias en células neuronales productoras de dopamina, como un método de cultivo en presencia de bFGF seguido de cultivo de agregados flotante (Studer, L. et al.: Nat. Neurosci., 1: 290-295, 1998), a method of culturing in the presence of bFGF and glia cell-conditioned medium (Daadi, M. M. and Weiss, S. J.: Neuroscience, 19: 4484-4497, 1999), un método que utiliza FGF8, Shh, bFGF, ácido ascórbico etc. (Lee, S. H. et al.: Nat. Biotechnol., 18 : 675-679, 2000), y un método de cocultivos con células estromales de médula ósea (Kawasaki, H. et al.: Neuron, 28 : 31-40, 2000), y después de la modificación apropiada de eso, si es necesario.

Un método compuesto por los dos pasos siguientes puede usarse para la inducción de la diferenciación de astrocitos. En el primer paso, las células madre de la pulpa dental se cultivan durante cuatro días en, por ejemplo, un medio DMEM/F12 que contiene suplemento de N2 y 10 ng/ml de bFGF, usando un plato doblemente recubierto con poli-L-ornitina y fibronectina. En el segundo paso, las células se cultivan durante tres días en el medio adicionalmente añadido con 80 ng/ml de LIF y 80 ng/ml de BMP2. Los astrocitos inducidos por diferenciación pueden confirmarse mediante inmunotinción usando un anticuerpo anti-GFAP.

Un método compuesto por los dos pasos siguientes puede usarse para la inducción de la diferenciación de oligodendrocitos. De manera similar a la inducción de diferenciación de astrocitos, en el primer paso, las células madre de la pulpa dental se cultivan durante cuatro días en, por ejemplo, un medio DMEM/F12 que contiene suplemento de N2, 10 ng/ml de bFGF y 0.5% de FCS, usando un plato doblemente recubierto con poli-L-ornitina y fibronectina. Como resultado de este paso, las células madre de la pulpa dental se inducen en células progenitoras de oligodendrocitos. En el siguiente segundo paso, las células se cultivan durante cuatro días en un medio DMEM/F12 que contiene 20 ng/ml de T3 (triiodotironina), 20 ng/ml de T4 (tiroxina) y suplemento de N2. Los oligodendrocitos inducidos por diferenciación pueden confirmarse usando un anticuerpo anti-O4.

Como un componente del segundo elemento constituyente, las células madre pluripotentes que se han inducido para diferenciarse en células neuronales se pueden usar además de, o en lugar de, las células madre de pulpa dental inducidas por diferenciación. Los ejemplos de células madre pluripotentes incluyen células madre pluripotentes inducidas (células iPS) y células madre embrionarias (células ES). Las "células madre pluripotentes inducidas (células iPS)" son células que tienen pluripotencia (multipotencia) y capacidad proliferativa que se producen mediante la reprogramación de células somáticas mediante la introducción de factores de reprogramación. Las células madre pluripotentes inducidas exhiben propiedades similares a las de las células ES. Las células iPS pueden producirse mediante diversos métodos de producción de células iPS que se han informado hasta el momento. Por supuesto, la aplicación de los métodos de producción de células iPS que se desarrollarán en el futuro también se contemplan, como una cuestión de rutina.

La técnica más básica entre los métodos de producción de células iPS es un método para introducir los cuatro factores transcripcionales de Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc en una célula usando un virus (Takahashi K, Yamanaka S: Cell 126 (4), 663 - 676, 2006; Takahashi, K, y col., Cell 131 (5), 861 - 72, 2007). También se informa el establecimiento de células iPS humanas mediante la introducción de los cuatro factores de Oct4, Sox2, Lin28 y Nonog (Yu J, et al: Science 318 (5858), 1917-1920, 2007). Establecimiento de células iPS mediante la introducción de los tres factores distintos de c-Myc (Nakagawa M, et al: Nat. Biotechnol. 26 (1), 101-106, 2008), los dos factores de Oct3/4 y Klf4 (Kim JB, et al: Nature 454 (7204), 646-650, 2008) o solo Oct3/4 (Kim JB, et al. al: Cell 136 (3), 411-419, 2009) también se ha informado. Además, una técnica de introducción de proteínas como productos de expresión de los genes en una célula (Zhou H, Wu S, Joo

JY, y col. Cell Stem Cell 4, 381-384, 009; Kim D, Kim CH, Moon JI, et. al: Cell Stem Cell 4, 472-476, 2009) también se ha informado. También se informa que el uso de, por ejemplo, un inhibidor (BIX-01294) contra la histona metiltransferasa G9a, el ácido valproico inhibidor de la histona deacetilasa (VPA) o BayK8644 permite mejorar la eficiencia de la producción, reducir los factores a introducir, etc. (Huangfu D, et al: Nat. Biotechnol. 26 (7), 795-797, 2008; Huangfu D, et al: Nat. Biotechnol. 26 (11), 1269-1275, 2008; Silva J, et al: PLoS. Biol. 6 (10), e 253, 2008). También se han llevado a cabo estudios sobre métodos de introducción de genes, y técnicas que usan retrovirus, así como lentivirus (Yu J, et al: Science 318 (5858), 1917-1920, 2007), adenovirus (Stadtfield M, et al: Science 322 (5903), 945-949, 2008), plásmidos (Okita K, y col.: Science 322 (5903), 949-953, 2008), vectores de transposones (Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, y col., Nature 458, 766-770, 2009; Kaji K, Norrby K, Pac a A, y col.: Nature 458, 771-775, 2009; Yusa K, Rad R, Takeda J, y col.: Nat Methods 6, 363-369, 2009) , o se han desarrollado vectores episomales (Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, et al: Science 324, 797-801, 2009) para la transfección.

Las células en las que ha tenido lugar la transformación en células iPS, es decir, la reprogramación, pueden seleccionarse utilizando, por ejemplo, la expresión de un marcador de células madre pluripotentes (marcador indiferenciado) tal como Fbx15, Nanog, Oct4, Fgf-4 , Esg-1 o Cript como indicador. Las células seleccionadas se recolectan como células iPS

Se proporcionan varios tipos de células ES de instituciones públicas o disponibles comercialmente. Los ejemplos de células ES de ratón incluyen células ES-E14TG2a (ATCC), células ES-D3 o similares (ATCC), células H1 (Centro Riken BioResource de ciudad de Tsukuba, Japón), células B6G-2 (Centro Riken BioResource, ciudad, Tsukuba, Japón), células R1 (Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Canadá), células ES de ratón (129SV, número de catálogo R-CMTI-1-15, R-CMTI-1A) (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Osaka, Japón) y células ES de ratón (C57/BL6, número de catálogo R-CMTI-2A (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Osaka, Japón). Las células ES de mono están disponibles, por ejemplo, en Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University. Las células ES humanas están disponibles, por ejemplo, en Stem Cell Research Center, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, WiCell Research Institute (Madison, EE. UU.) Y ES Cell International Pte Ltd (Singapur). Se han logrado métodos para establecer células ES, y parte de los mismos se han practicado rutinariamente. Por lo tanto, uno puede establecer células ES deseadas usando métodos ordinarios. Por ejemplo, Nagy. A. et al. eds., Manipulating the Mouse Embryo, A Laborator y Manual, Tercera edición, Cold spring Harbor Laboratory Press, 2003, Jikken-igaku Bessatsu Baiyousaiboujikkenn Handbook (Culture Cell Experiment Handbook (volumen suplementario de medicina experimental)), Yodosha Co., Ltd. se puede hacer referencia con respecto al método para establecer células ES de ratón. Para los métodos para establecer células ES de mono, se puede hacer referencia a Suemori H, Tada T, Torii R, y col., Dev Dyn 222, 273-279, 2001, etc. Para el método para establecer células ES humanas, Wassarman, P.M. et al.: Methods in Enzymology, Vol.365 (2003), etc. pueden ser referenciados.

La composición de tratamiento de enfermedades del SNC está preferiblemente libre de suero. La ausencia de suero en la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC mejora la seguridad de la composición. Por ejemplo, se puede preparar un medio acondicionado libre de suero cultivando células madre de pulpa dental en un medio que no contiene ningún suero (medio libre de suero). En el caso de subcultivo para un pasaje o pasajes plurales, se puede obtener un medio acondicionado libre de suero llevando a cabo el subcultivo para el último pase, o para los últimos pases, en un medio libre de suero. También se puede obtener un medio acondicionado libre de suero eliminando el suero de un medio acondicionado recogido, usando, por ejemplo, sustitución de disolvente por diálisis o columna.

La composición de tratamiento de la enfermedad del SNC se utiliza para el tratamiento de enfermedades de los nervios centrales (cerebro y médula espinal). Ejemplos de enfermedades del SNC a las que se puede aplicar la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC incluyen lesión de la médula espinal, enfermedades neurodegenerativas tales como esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Huntington, atrofia de sistema múltiple y ataxia espinocerebelar, degeneración o pérdida de células neuronales causadas por isquemia cerebral, hemorragia intracerebral o infarto cerebral, y una enfermedad retiniana que involucra un trastorno de células neuronales. La aplicación de la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC promueve la regeneración y la cicatrización de los tejidos del SNC debido a sus efectos de excrecencia de neuritas y/o sus efectos inhibidores de la apoptosis hacia las células neuronales. Cualquier enfermedad o trastorno al que el tratamiento basado en este mecanismo sea efectivo puede ser la enfermedad diana de la invención, independientemente del tipo o causa (por ejemplo, causa principal como lesión externa o infarto cerebral o causa secundaria como infección o tumor) de la enfermedad o trastorno.

La lesión de la médula espinal se refiere a un estado en el cual la médula espinal se daña por un impacto externo o por un factor interno como un tumor espinal o una hernia, y se clasifica de acuerdo con el tipo completo (un estado en el cual la columna vertebral está completamente cortada en un cierto punto) y de tipo incompleto (un estado en el que la función de la médula espinal se mantiene parcialmente aunque la médula espinal esté dañada o comprimida), según el grado del daño. Con la tecnología médica actual, no se puede lograr la recuperación completa de la lesión de la médula espinal y se desea establecer un nuevo método de tratamiento. La lesión de la médula espinal es una de las enfermedades a las que se espera aplicar la medicina regenerativa, y se está investigando el uso de médula ósea, células madre neuronales, células madre embrionarias, células madre pluripotentes artificiales, etc. Sin embargo, una técnica de tratamiento decisiva no se ha realizado debido a diversos problemas. Bajo tal circunstancia, la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC proporciona un método de tratamiento que se espera que proporcione un alto efecto terapéutico, y la importancia y el valor del mismo es bastante alto.

Otras enfermedades o trastornos a los que se puede aplicar la composición de tratamiento de enfermedades del SNC incluyen infarto cerebral causado por degeneración o pérdida de células neuronales causadas por isquemia cerebral, hemorragia intracerebral o similares en la fase aguda o fase subaguda y leucomalacia periventricular, que es una encefalopatía neonatal causada por isquemia hipóxica durante el período perinatal. La isquemia cerebral es un estado en el que el suministro de sangre al cerebro es insuficiente, y el oxígeno y los nutrientes no se suministran lo suficiente al cerebro. La isquemia cerebral causa la muerte de las células neuronales y el edema cerebral, y sirve como causa de infarto cerebral. La composición de la invención se puede aplicar también al tratamiento de la destrucción de células neuronales debido a isquemia cerebral o similares, o diversas enfermedades que acompañan a la destrucción de células neuronales.

La enfermedad de Parkinson, la ataxia espinocerebelosa, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la atrofia de sistema múltiple y la parálisis supranuclear progresiva son enfermedades neuronales intratables causadas por la pérdida neuronal específica de la región en las regiones del cerebro, mesencéfalo y cerebelo. La composición de tratamiento de la enfermedad del SNC es capaz de ejercer un efecto terapéutico suprimiendo la degeneración neuronal y la pérdida de estas enfermedades.

La composición de tratamiento de la enfermedad del SNC también se puede aplicar a enfermedades retinianas acompañadas de trastornos de células neuronales. De acuerdo con la clasificación aproximada, cinco tipos de células neuronales-células fotorreceptoras (células fotorreceptoras de cono, células fotorreceptoras de barra), células bipolares, células horizontales, células amacrinas y células ganglionares están presentes en la retina. La composición de tratamiento de la enfermedad del SNC ejerce un efecto terapéutico al suprimir la muerte y la pérdida neuronal en enfermedades retinianas causadas por daño a un tipo, o dos o más tipos, seleccionados de estas células neuronales presentes en la retina, así como en enfermedades retinianas con afecciones patológicas exhibiendo daño a un tipo, o dos o más tipos, seleccionados de estas células neuronales, ejemplo de los cuales incluyen desprendimiento de retina traumático, rotura de retina, conmoción cerebral de retina, fractura del conducto óptico, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, retinitis pigmentosa, glaucoma, coroideremia, neuropatía óptica hereditaria de Leber, distrofia de cono, drusas familiares, distrofia corioidea areolar central y atrofia óptica autosómica dominante.

Otros ingredientes pueden usarse adicionalmente en la composición de la invención, siempre que se mantenga el efecto terapéutico esperado. Los ingredientes que pueden usarse adicionalmente incluyen los enumerados a continuación.

(i) Materiales bioabsorbibles

Ácido hialurónico, colágeno, fibrinógeno (por ejemplo, BOLHEAL (marca registrada)), etc., se pueden usar como materiales orgánicos bioabsorbibles.

(ii) Materiales gelificantes

Los materiales gelificantes para uso tienen preferiblemente alta bioafinidad, y se puede usar adhesivo de ácido hialurónico, colágeno o fibrina o similar. Se pueden seleccionar y usar diversos ácidos hialurónicos y colágenos, y es preferible adoptar los adecuados para el propósito de la aplicación de la composición de la invención (el tejido al que se aplicará la composición). Los colágenos a usar son preferiblemente solubles (colágenos solubles en ácidos, colágenos solubles en álcalis, colágenos solubilizados en enzimas, etc.).

(iii) Otros

Otros ingredientes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, vehículos, excipientes, disgregantes, agentes tampón, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes calmantes, estabilizadores, conservantes, agentes antisépticos, solución salina fisiológica, etc.) pueden estar contenidos. Lactosa, almidón, sorbitol, D-manitol, azúcar blanco, etc. se pueden usar como excipientes. Se pueden usar almidón, carboximetilcelulosa, carbonato de calcio, etc. como disgregantes. Las sales de ácido fosfórico, sales de ácido cítrico, sales de ácido acético, etc. pueden usarse como agentes tamponantes. La goma arábiga, el alginato de sodio, Tragacanto, etc. pueden usarse como agentes emulsionantes. Se pueden usar monoestearato de glicerina, monoestearato de aluminio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, lauril sulfato de sodio, etc. como agentes de suspensión. Se pueden usar alcohol bencílico, clorobutanol, sorbitol, etc. como agentes calmantes. El propilenglicol, el ácido ascórbico, etc. pueden usarse como estabilizantes. El fenol, el cloruro de benzalconio, el alcohol bencílico, el clorobutanol, el metilparabeno, etc. pueden usarse como conservantes. El cloruro de benzalconio, el ácido parahidroxibenzoico, el clorobutanol, etc. pueden usarse como agentes antisépticos. Los antibióticos, los agentes de ajuste del pH, los factores de crecimiento (como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)), etc. también pueden estar contenidos.

La forma final de la composición para el tratamiento de la enfermedad del SNC no está particularmente limitada. Los ejemplos de la forma incluyen formas líquidas (tales como una forma puramente líquida y una forma de gel) y formas sólidas (tales como una forma pulverulenta, una forma de grano fino y una forma granular).

Los métodos para producir la composición de tratamiento de enfermedades del SNC no están particularmente limitados. Un método de producción que incluye los siguientes pasos (1) a (3) es preferible:

(1) un paso de seleccionar células adhesivas de las células de pulpa dental;

(2) un paso de cultivo de las células adhesivas; y

(3) un paso de recolectar un medio acondicionado.

Cada paso se describe a continuación

En el paso (1), las células madre de la pulpa dental, que son células adhesivas, se seleccionan de células de pulpa dental. Las células de pulpa dental se pueden preparar aislando de un organismo vivo de antemano. Este paso de selección puede incluir la preparación de células de pulpa dental. A continuación, se describe un ejemplo específico de un procedimiento de una serie de operaciones desde la preparación de células de pulpa dentales hasta la selección de células madre de pulpa dental.

(a) Recolección de pulpa dental

Un diente caducifolio exfoliado naturalmente (o un diente caducifolio extraído o un diente permanente) se desinfecta usando una solución de clorhexidina o ISODINE, y, a partir de entonces, se divide la parte de la corona dental y se recolecta tejido de la pulpa dental utilizando un escariador dental.

(b) Tratamiento con enzima

El tejido de pulpa dental recogido se suspende en un medio basal (medio Eagle modificado de Dulbecco que contiene 10% de suero bovino y un antibiótico), y se trata con 2 mg/ml de collagenasa y DISPASE a 37°C por 1 hora. Las células de pulpa dental después del tratamiento enzimático se recogen por centrifugación (5.000 rpm) durante 5 minutos. La separación celular usando un filtro de células no debería llevarse a cabo básicamente ya que disminuye la eficiencia de recolección de la fracción de células madre neuronales como SHED o DPSC.

(c) Selección de células adhesivas

Las células se vuelven a suspender en 4 cc del medio basal, y se siembran en una placa de cultivo para células adhesivas que tienen un diámetro de 6 cm. Después de añadir un medio (por ejemplo, medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene FCS al 10%), las células se cultivan en una incubadora mantenida al 5% de CO₂ y a 37°C durante aproximadamente dos semanas. Después de eliminar el medio, las células se lavan con, por ejemplo, PBS por una o pocas veces. Esta operación (la eliminación del medio y el lavado de las células) puede reemplazarse por la recolección de células adhesivas (células madre de la pulpa dental) que han formado colonias. En este caso, por ejemplo, el tratamiento con tripsina-EDTA al 0.05% se lleva a cabo a 37°C durante 5 minutos, y se recogen las células que se han desprendido del plato.

En el paso (2) siguiente al paso (1), se cultivan las células adhesivas seleccionadas. Por ejemplo, las células se siembran en una placa de cultivo para células adhesivas, y se cultivan en una incubadora mantenida al 5% de CO₂ y a 37°C. El subcultivo se lleva a cabo, si es necesario. Por ejemplo, cuando la observación visual confirmó que las células alcanzaron la subconfluencia (el estado en el que las células cubren aproximadamente el 70% del área de superficie del recipiente de cultivo) o confluencia, las células se separaron del recipiente de cultivo y se cosecharon, y se sembraron de nuevo en un recipiente de cultivo lleno de un medio de cultivo. El subcultivo puede llevarse a cabo repetidamente. Por ejemplo, el subcultivo se puede llevar a cabo de uno a ocho pases, permitiendo de este modo que las células proliferen hasta el número de células requerido (por ejemplo, aproximadamente 1×10^7 células/ml). Aquí, el desprendimiento de las células del recipiente de cultivo se puede llevar a cabo usando un método ordinario tal como el tratamiento con tripsina. Después del cultivo descrito anteriormente, las células se pueden cosechar y almacenar (en las cuales la condición de almacenamiento puede ser, por ejemplo, -198°C). Las células recogidas de diversos donantes pueden almacenarse en forma de un banco de células madre de pulpa dental.

El medio puede ser, por ejemplo, un medio basal o un medio basal suplementado con suero o similar. Sin embargo, en el caso de preparar un medio acondicionado de células madre de pulpa dental libres de suero, se puede usar un medio libre de suero durante todo el proceso o subcultivando para el último paso o para los últimos pocos pasos. El DMEM, el medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM) (GIBCO Corporation, etc.), el medio F12 de Ham (HamF12) (Sigma-Aldrich Corporation, GIBCO Corporation, etc.), el medio RPMI1640, etc., se pueden usar como medio basal. Se pueden usar dos o más medios basales en combinación. Un ejemplo de un medio mixto es un medio formado mezclando cantidades equivalentes de IMDM y HamF12 (disponible comercialmente como, por ejemplo, IMDM/HamF12 (nombre comercial, GIBCO Corporation)). Los ejemplos de ingredientes que se pueden agregar al medio incluyen sueros (tales como suero bovino fetal, suero humano y suero de oveja), sustitutos del suero (reemplazo sérico definitivo (KSR), etc.), albúmina sérica bovina (BSA), antibióticos, diversas vitaminas y diversos minerales.

En el paso (3) siguiente al paso (2), se recoge el medio acondicionado de las células madre de la pulpa dental seleccionadas y cultivadas mediante el método descrito anteriormente. Por ejemplo, el medio acondicionado puede recogerse succionando el medio de cultivo usando un cuentagotas de una pipeta. El medio acondicionado recogido se usa como ingrediente activo de la composición de la invención, directamente o después de someterse a uno o más tratamientos. Los ejemplos de los tratamientos incluyen centrifugación, concentración, sustitución de disolventes, diálisis, congelación, secado, liofilización, dilución, desalinización y almacenamiento (por ejemplo, 4°C o -80°C). El medio acondicionado a células madre de pulpa dental exhibió la actividad esperada (actividad de excrecencia de neuritas y actividad inhibidora de la apoptosis) incluso sin alta purificación compleja, como se muestra en los ejemplos descritos más adelante. Esto significa que la composición de la invención eficaz para las enfermedades del SNC puede producirse mediante simples pasos. La ausencia de la necesidad de un paso de purificación compleja es ventajosa también porque se puede evitar una disminución de la actividad causada por la purificación.

Para confirmar la calidad del medio acondicionado, el medio acondicionado recogido se puede someter al siguiente paso (a) o paso (b), o ambos.

(a) un paso de verificación del medio acondicionado con respecto a la presencia o ausencia de una actividad de excrecencia de neurita en presencia de una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa

(b) un paso de verificación del medio acondicionado con respecto a la presencia o ausencia de una actividad inhibidora de la apoptosis hacia las células neuronales

Se espera que un medio acondicionado que exhibió un resultado positivo en el paso (a) se espera que proporcione un efecto terapéutico excelente por su actividad de excrecencia de neuritas. De forma similar, se espera que un medio acondicionado que exhibió un resultado positivo en el paso (b) se espera que proporcione un efecto terapéutico excelente por su actividad inhibidora de la apoptosis hacia las células neuronales. Es preferible llevar a cabo tanto el paso (a) como el paso (b), y usar un medio acondicionado que exhibió un resultado positivo en ambos pasos como ingrediente activo de la composición de la invención. Los métodos para verificar en los pasos (a) y (b) son como se describió anteriormente (en la sección que trata el primer aspecto de la invención). La calidad de un medio acondicionado recolectado, preparado o almacenado también se puede verificar a través de los pasos (a) y (b). Por lo tanto, se entiende que estos pasos tienen una gran utilidad y valor como método para determinar la calidad de un medio acondicionado con células madre de pulpa dental (es decir, como un medio para determinar la idoneidad como ingrediente activo para el tratamiento de enfermedades del SNC).

Método para concentrar el medio acondicionado con células madre

Con respecto a la composición de tratamiento de partes dañadas y la composición de tratamiento de enfermedades del SNC abarcada por la invención, las sustancias fisiológicamente activas contenidas en el medio acondicionado con células madre pueden formularse como fármaco. Esto permite, por ejemplo, que una sustancia activa regeneradora de nervios se formule como un fármaco. Para el método de concentración del medio acondicionado por células para la formulación del fármaco, se pueden aplicar los métodos habitualmente empleados para este fin. Los ejemplos del método de concentración incluyen los dos métodos siguientes

1. Método de concentración de la columna de centrifugación

El medio acondicionado se concentra (hasta 75 veces) usando un AMICON ULTRA CENTRIFUGAL FILTER UNITS-1 0K (fabricado por Millipore Corporation). El procedimiento específico de operación del mismo es como se describe a continuación

(i) Agregue el medio acondicionado (hasta 15 ml) en un AMICON ULTRA CENTRIFUGAL FILTER UNITS-10K, y centrifugue a 4000 x g durante aproximadamente 60 minutos para concentrar hasta 200 µl

(ii) Agregue la misma cantidad de PBS estéril que el medio acondicionado en el tubo, y centrifugue nuevamente a 4000 x g durante aproximadamente 60 minutos para sustituir la solución basal con el PBS.

(iii) Recoja los 200 µl de la solución obtenida en un microtubo. La solución recolectada sirve como un medio concentrado acondicionado con células madre

2. Método de concentración de precipitación de etanol

El medio acondicionado se concentra (hasta 10 veces) usando un método de precipitación con etanol. El protocolo específico de los mismos es el siguiente

(i) Agregue 45 ml de etanol al 100% a 5 ml del medio acondicionado, mezcle bien la solución y déjela a -20°C durante 60 minutos

(ii) Centrifugar a 15,000 x g a 4 °C durante 15 minutos

(iii) Eliminar un sobrenadante, añadir 10 ml de etanol al 90% y agitar bien

(iv) Centrifugar a 15,000 x g a 4 °C durante 5 minutos

(v) Retire un sobrenadante, disuelva el sedimento resultante en 500 µl de agua estéril y recoja la solución resultante en un microtubo. La solución recolectada sirve como un medio concentrado acondicionado con células madre

Método de liofilización del medio acondicionado con células madre

Como se divulgó aquí, el medio acondicionado con células madre en la composición de la invención se puede liofilizar. Esto proporciona una excelente estabilidad de almacenamiento. El método de liofilización del medio acondicionado con células madre puede ser cualquier método empleado habitualmente para este fin. Los ejemplos del método de liofilización incluyen el siguiente método:

(i) congelar el medio acondicionado con células madre o el medio acondicionado con células madre concentradas obtenido por el método descrito anteriormente a -80°C durante 2 horas a medio día.

(ii) abrir la tapa del tubo de muestra después de la congelación, y colocar el tubo de muestra en un liofilizador.

(iii) liofilización de la muestra durante uno o dos días.

(iv) obtener la muestra resultante, que sirve como un medio acondicionado de células madre liofilizadas (capaz de almacenarse a -80 °C).

También se divulga aquí un método para tratar una enfermedad del SNC que incluye un paso de administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC a un paciente con enfermedad del SNC. La ruta de administración de la composición de la invención no está particularmente limitada siempre que la composición se administre al tejido diana. La composición se puede aplicar, por ejemplo, mediante administración tópica. Los ejemplos de la administración tópica incluyen la inyección en el tejido diana o la aplicación al tejido diana. La composición de la invención se puede administrar por administración intravenosa, administración intraarterial, administración intraportal, administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular o administración intraperitoneal. El régimen de dosificación puede ser, por ejemplo, de una a varias veces al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días o similar. El régimen de dosificación puede prepararse teniendo en cuenta el sexo, la edad, el peso, el estado patológico, etc. del sujeto (receptor). El sujeto al que se administra la composición de la invención es típicamente un paciente humano que padece una enfermedad del SNC. Sin embargo, la aplicación a mamíferos que no sean humanos (incluidos animales de compañía, animales de granja y animales de laboratorio, cuyos ejemplos específicos incluyen ratones, ratas, conejillos de indias, hámsters, monos, ganado, cerdos, cabras, ovejas, perros, gatos, etc.) también está contemplado. La composición de la invención se administra a un sujeto en la fase aguda o subaguda, de modo que los efectos de la composición de la invención se ejercen más

Simultáneamente con o después de la administración de la composición de tratamiento de la enfermedad del SNC, las células madre de la pulpa dental se pueden administrar al mismo sujeto, proporcionando de ese modo un efecto complejo o continuo. Aquí, las células madre de pulpa dental indiferenciadas que no han sido sometidas a tratamiento de inducción de diferenciación después de su obtención, o células madre de pulpa dental inducidas por diferenciación que han sido inducidas a diferenciarse en una célula neuronal después de su obtención, pueden usarse como células madre de pulpa dental. En el caso de administrar células madre de pulpa dental simultáneamente con la administración de la composición de tratamiento de enfermedades del SNC, es preferible administrar células madre de pulpa dental indiferenciadas para que se ejerzan efectos terapéuticos elevados. En el caso de administrar células madre de pulpa dental después de la administración de la composición de tratamiento de enfermedades del SNC, es preferible usar células madre de pulpa dental inducidas por diferenciación que se han inducido para diferenciarse en células neuronales. También es posible usar células madre pluripotentes (tales como células iPS o células ES) que se han inducido para diferenciarse en células neuronales además de, o en lugar de, las células madre de pulpa dental inducidas por diferenciación

Los ejemplos de la invención se describen a continuación, pero no se limitan a los mismos. En los ejemplos, "%" se basa en el peso (masa) a menos que se especifique lo contrario.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Materiales y métodos

(1) Sujetos y cultivos celulares

Se obtuvieron tejidos de pulpa dental humana a partir de dientes deciduos extraídos clínicamente sanos y dientes permanentes de ocho pacientes. Estos protocolos experimentales fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Nagoya. SHED y DPSC se aislaron y cultivaron como se describe en Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 13625-30 o Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100: 5807-12.

Brevemente, la pulpa se retiró suavemente y se digirió en una solución de 3 mg/ml de colagenasa tipo I y 4 mg/ml de dispasa a 37°C durante 1 hora. Después de la filtración usando filtros de células de 70 mm (Falcon; BD Labware, Franklin Lakes, NJ), las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; GIBCO, Rockville, MD) que contenía 20% de suplemento de crecimiento celular mesenquimal (Lonza Inc., Walkersville, MD) y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin y 0.25 mg/ml de anfotericina B; GIBCO) a 37°C con 5% de CO₂. Después del cultivo primario, las células se subcultivaron a aproximadamente 1x10⁴ células/cm². Las células pasadas de una a tres veces se usaron en los experimentos. Se adquirieron BMMSC humanos de Lonza Inc., y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(2) Análisis de la proliferación celular

Se evaluaron las tasas de proliferación de SHED, DPSC y BMSC mediante incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) durante 12 horas usando un kit de tinción BrdU (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (n=3 para cada grupo). El experimento fue repetido cinco veces. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron mediante la prueba de Tukey-Kramer después del análisis de varianza de una vía.

Para la inmunofluorescencia de STRO-1, SHED, DPSC y BMSC se fijaron con paraformaldehído al 3%, y luego se enjuagaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato, y se trataron con glicina 100 mM durante 20 minutos. Las células se permeabilizaron con 0.2% de Triton-X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 30 minutos, y posteriormente se incubaron en una mezcla de 5% de suero de burro y 0.5% de soro albúmina bovina durante 20 minutos. A continuación, las células se incubaron con un anticuerpo antihumano STRO-1 de ratón (1:100; R&D, Minneapolis, MN) como anticuerpo primario durante 1 hora, se incubaron durante 30 minutos con anticuerpo de cabra M-FITC de inmunoglobulina de ratón (1:500; Southern Biotech, Birmingham, AL) como un anticuerpo secundario, y se montó usando Vectashield con DAPI (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA)

(3) Experimento con animales (figura 1)

Se proporcionaron ratones hembra sin pelo de cinco semanas (Hos: HR-1) de SLC Inc. (Shizuoka, Japón). Todos los ratones fueron alojados en cuartos con control climático (22 ± 1 °C a 50% de humedad) con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. Se permitió a los animales el libre acceso al agua y una dieta de comida, y se observaron diariamente. Los ratones se irradiaron dorsalmente utilizando un sistema de emisión de UVB RMX-3W (Handok Biotech, Seúl, Corea) durante ocho semanas, cinco veces a la semana. Se utilizó un banco de 10 lámparas Toshiba SE sin ningún filtro para UVB (el pico de emisión era de aproximadamente 312 nm, y la irradiancia entre 290 y 320 nm correspondía al 55% de la cantidad total de UVB). La distancia de las lámparas a la espalda de los animales fue de 89 cm. Durante la exposición, a los animales se les permitió moverse libremente en sus jaulas. La dosis de irradiación fue de 1 MED (dosis eritematosa mínima: 60 mJ/cm²) en las dos primeras semanas, 2 MED (120 mJ/cm²) en la tercera semana, 3 MED (180 mJ /cm²) en la cuarta semana, y 4 MED (240 mJ/cm²) en la quinta a la octava semana. La dosis total de UVB fue de aproximadamente 115 MED (6.9 J/cm²). Cinco semanas después de la inducción de arrugas, se inyectó por vía subcutánea SH-CM (100%) en el área restringida de los ratones. En un control positivo, SHED suspendido en PBS (4 x 10⁵) se inyectó directamente en la dermis. En un control negativo, la dermis se trató solo con PBS

(4) Preparación de SH-CM

Se cultivaron SHED (4 x 10⁵ células) en medio libre de suero DMEM/F12 (Invitrogen-Gibco-BRL, Grand Island, NY). Se recogió medio acondicionado de SHED después de 72 horas de cultivo, se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos y se filtró usando un filtro de jeringa de 0.22 mm

(5) Réplica de la piel y análisis de imagen

En el momento de la inducción de arrugas y una semana después de la inyección, se tomaron réplicas negativas de la superficie de la piel dorsal utilizando un material de impresión basado en silicio, FLEXTIME1 (Heraeus Kulzer, Nueva York, NY). Para obtener réplicas de las arrugas de la misma área de la piel, la piel se marcó con un rotulador a base de aceite. Cinco semanas después de la inyección final de SH-CM o SHED en la piel, se tomaron impresiones del área marcada. Para facilitar la medición, todas las réplicas se cortaron en piezas cuadradas de 1 cm, y la parte posterior de cada réplica se procesó en un plano plano utilizando el mismo material de impresión. La luz se dirigió a un ángulo de 208°, y las imágenes se incorporaron de la réplica utilizando una cámara CCD. La imagen de las réplicas negativas se observó usando un sistema de análisis de arrugas, visómetro de piel SV 600 (Courage & Khazaka, Colonia, Alemania). Los parámetros utilizados en la evaluación de las arrugas de la piel son el número, la profundidad y el área de la misma

(6) Histología

Las pieles dorsales (1 cm x 1 cm) se fijaron con una solución tamponada neutra en formalina al 10%, se embebieron en cera de poliéster y se seccionaron a 6 mm. Las secciones se sometieron a tinción con hematoxilina y eosina (H&E) y tinción de tricómico de Masson

5 (7) Cultivo de HDF y dosis de irradiación UVB

Se cultivaron HDF en un DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina a 37°C con 5% de CO₂. Después de inanición con medio exento de suero durante 24 horas, las células se lavaron con PBS y se expusieron a UVB con 3 a 4 gotas de PBS. La irradiación UVB se llevó a cabo usando una fuente de luz UV (Waldmann, Schwenningen, Alemania). Inmediatamente después de la irradiación, se aspiró el PBS y se reemplazó con un medio completo. Las dosis de irradiación UVB se variaron en el intervalo de 50 a 250 mJ/cm² durante la prueba, y finalmente se fijaron a 70 mJ/cm² para una mayor experimentación

15 (8) Ensayo de proliferación celular

Se pusieron en placa HDF a una densidad de 5 x 10³ células/pozo en placas de 96 pozos, y se midió la proliferación de HDF usando un kit CCK-8 (Dojindo, Gaithersburg, MD). Después de inanición durante 24 horas en un medio exento de suero, las células se cultivaron continuamente durante 24 horas con o sin SH-CM, y se expusieron a UVB (70 mJ/cm²) durante 90 segundos. Luego, las células irradiadas con UVB se cultivaron en un medio completo durante 24 horas y se recogieron. Se añadieron HDF a 10 ml de la solución de CCK-8, y se incubaron durante 3 horas. La absorbancia se midió a 450 nm usando un lector de microplacas (TECAN, Grodig, Austria). Los valores de OD de cada pozo se convirtieron en sus números de células relativas en base a una curva estándar comparativa

25 (9) Análisis de transferencia Western

Se sembraron HDF (2 x 10⁴ células/pozo) en placas de 24 pozos, y se pretrataron como se describió anteriormente. Luego, las células se lisaron en un tampón RIPA (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% SDS, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM ditiotretol, 1 mg/ml leupeptina y 20 mg/ml de PMSF, pH 7.4). Cincuenta microgramos de proteínas se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 8% por electroforesis. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se incubó con un anticuerpo anticógeno de tipo I (Santa Cruz, Saint Louis, MO) y un anticuerpo antimetaloproteínasa-1 de matriz (MMP-1) (Calbiochem, Darmstadt, Alemania). A continuación, la membrana se lavó y se incubó con anticuerpo IgG anticabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:10.000, Santa Cruz, Saint Louis, MO). Las transferencias se hicieron reaccionar con un reactivo de inmunoglobulina Western y se expusieron a una película de rayos X.

35 Resultados:

(1) Caracterización de SHED, DPSC y BMSC

SHED y DPSC mostraron una morfología fibroblástica que se asemeja a BMSC (Fig.2A-C). El análisis de inmunofluorescencia indicó que SHED, DPSC y BMSC contenían células positivas para STRO-1 (Fig. 2D-F). La tasa de proliferación de SHED fue significativamente más alta que las de DPSC y BMSC (Fig. 2G)

(2) SH-CM alivió las arrugas inducidas por UV

Durante el período de exposición a los rayos UV, se observó que los ratones presentaban arrugas finas de la piel. Sin embargo, el grupo tratado con SH-CM y el grupo inyectado con SHED parecían tener menos arrugas que el grupo de PBS durante el tratamiento (n = 8 para cada grupo). En un análisis de la réplica, la Fig. 3 y la Fig. 4 muestran que el tratamiento repetido con SH-CM aliviaba las arrugas finas inducidas por la irradiación con UVB. El grupo inyectado SHED mostró la misma tendencia que el del grupo SH-CM. Cuando los inventores midieron los parámetros para las arrugas de las réplicas con el visómetro de piel SV 600, la inyección de nivel natural (100%) de SH-CM redujo significativamente todos los parámetros de las arrugas. Sin embargo, la piel tratada con SHED presenta mayor efectividad que el grupo SH-CM.

(3) Observación histológica

Se investigó el efecto de SH-CM sobre el grosor dérmico en ratones sin pelo irradiados con UVB, que mostraron grandes cambios en los apéndices de la piel. La Fig. 5 muestra las mediciones histológicas del espesor dérmico de la piel del ratón sin pelo mediante tinción con H&E. Las fibras de colágeno se tiñen como se muestra en la figura 5, y el grado de tinción es notablemente alto en el grupo tratado con SH-CM (A) y el grupo inyectado en SHED (B). La medición del grosor dérmico mostró aumentos significativos en el grupo inyectado SHED y el grupo tratado con SH-CM (Fig. 6). Además, se observó un marcado aumento de los haces de colágeno en ambos grupos, pero no se observó en el grupo control (Fig. 5)

(4) SH-CM aumento de la proliferación de HDF

Con el fin de seguir estudiando el mecanismo paracrino con respecto al alivio de las arrugas de la piel por SHED, se realizó un ensayo de proliferación celular en HDF que se habían cultivado principalmente con SH-CM. Aunque la

irradiación UVB disminuyó significativamente la proliferación de HDF, el pretratamiento con SH-CM mostró un efecto protector sobre los HDF (Fig.7). SH-CM contiene diversos factores de crecimiento, y en un caso en el que una característica única de los factores de crecimiento es su capacidad de iniciar la mitosis de células quiescentes, es posible que la proliferación mejorada por SH-CM en este experimento esté mediada por los factores de crecimiento secretado de SHED

(5) Expresión del colágeno tipo I y MMP-1

Dado que el contenido de colágeno en la dermis aumentó significativamente en los ratones sin pelo tratados con SH-CM, las expresiones proteicas de colágeno tipo I y MMP-1 se examinaron en HDF después del tratamiento SH-CM (Fig. 8). La irradiación UVB redujo claramente la expresión proteica del colágeno tipo I e indujo la de MMP-1. Sin embargo, la expresión proteica del colágeno tipo I aumentó significativamente después del pretratamiento SH-CM, mientras que la de MMP-1 disminuyó después del pretratamiento SH-CM. Estos resultados indican que el aumento del contenido de colágeno en la dermis de los ratones sin pelo tratados con SH-CM estaba mediado por la estimulación de la síntesis de colágeno y la inhibición de la degradación del colágeno en los fibroblastos dérmicos

Discusión

Las características de SHED se compararon con las de DPSC y BMSC, que se consideran fuentes estándar de células madre en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa. Los resultados indicaron que SHED posee una alta capacidad de proliferación, que se potencia en presencia de una matriz extracelular, lo que sugiere que SHED es una fuente útil para la terapia basada en células madre. Las células positivas para STRO-1 se encontraron en SHED, DPSC y BMSC. Se sabe que STRO-1 reconoce un antígeno de superficie celular resistente a tripsina presente en una subpoblación de células de médula ósea, incluyendo una proporción predominante de células madre esqueléticas que tienen un alto potencial de crecimiento y diferenciación, y poblaciones fibroblásticas unitarias que forman colonias. La alta capacidad proliferativa es una de las características más críticas de las células madre somáticas postnatales. El estudio de proliferación utilizando BrdU reveló que SHED muestra la mayor tasa de población entre SHED, DPSC y BMSC. Se informó previamente que el análisis de microarreglos reveló que SHED expresa múltiples factores de crecimiento tales como FGF, TGF- β , CTGF, NGF y BMP asociados con esta vía, a niveles elevados (S. Nakamura, Y. Yamada et al., Stem Cell Proliferation Pathways Comparison between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp, JOE, Vol.35, (11), 1536-1542, 2009). FGF2 se reportó como una citocina que actúa para promover la proliferación de numerosos tipos de células y controlar la generación de matriz extracelular durante la regeneración tisular y la curación de heridas

Los factores paracrin, tales como VEGF, KGF o FGF, se pueden usar para la regeneración de la piel, y esto sugiere que el trasplante de células madre también es una terapia de citocinas "basada en células". De manera importante, los medios acondicionados que contienen factores de crecimiento se pueden usar para evitar el efecto negativo de los UVB en los HDF. El concepto de efectos paracrin que median al menos parte de los efectos de la terapia con células madre no es inconsistente con los datos previos. La terapia con citocinas basadas en células puede proporcionar beneficios en la cicatrización de heridas. La diferenciación de queratinocitos por factores de crecimiento derivados de SHED puede contribuir a la reepitelización en el cierre de la herida. Además, los factores de crecimiento derivados de SHED pueden proporcionar beneficios en la cicatrización de heridas, la remodelación de tejidos y la génesis de injertos de piel.

El fotoenvejecimiento es un proceso complejo que tiene similitudes patológicas con las heridas de la piel. Las MSC desempeñan una función clave en este proceso e interactúan con los queratinocitos, las células adiposas y los mastocitos. Las MSC también son una fuente de proteínas de matriz extracelular, de las cuales los colágenos fibrilares tipo I y tipo III se reducen significativamente en la dermis papilar, y se ha demostrado que su reducción se correlaciona bien con la gravedad clínica del fotoenvejecimiento. Esta reducción es el resultado de una combinación de biosíntesis reducida de procógeno y aumento de la degradación enzimática a través de las acciones de MMP. Fisher et al. mostraron que la irradiación UV inducía la síntesis de MMP en piel humana in vivo (Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM., Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues, J Periodontol Res. 1997 Jan; 32(1 Pt 2):159-165; Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, et al., Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. Nature 1996; 379: 335-339). Entre la familia MMP, MMP-1, MMP-13 y MMP-14 de tipo membrana muestran actividad colagenolítica, y se informó que MMP-2 y MMP-9 son elastasas verdaderas. La destrucción de colágeno y elastina mediada por MMP representa una gran parte del daño del tejido conectivo que ocurre en la piel fotodañada (Tsukahara K, Nakagawa H, Moriwaki S, Takema Y, Fujimura T, Imokawa G, Inhibition of ultraviolet-B-induced wrinkle formation by an elastase-inhibiting herbal extract: implication for the mechanism underlying elastase-associated wrinkles, Int J Dermatol 2006; 45: 460-468)

En este estudio, se encontró que SH-CM no solo inhibe una disminución inducida por UVB del colágeno de tipo I, sino que también atenúa la expresión de MMP-1 inducida por UVB en HDF. La curación de heridas y el rejuvenecimiento de la piel a partir de fotodaño son procesos complejos pero ordenados y se orquestan a través de citocinas y factores de crecimiento. Por lo tanto, estos datos, cuando se combinan con el presente estudio, implican que la liberación local de citocinas puede ser un factor importante que medie los efectos beneficiosos de rejuvenecimiento SHED observados después del suministro de SH-CM. El suministro local de SHED puede contribuir a la curación también a través del retorno de las células progenitoras madre circulantes a la región de la lesión

En conclusión, bajo una circunstancia en la que la aplicación de SHED para la cicatrización de heridas dérmicas todavía era especulativa, la interacción entre los factores de crecimiento derivados de SHED y HDF se investigó por primera vez. SHED ejerce efectos sobre los HDF causando un aumento en la síntesis de colágeno y activando la actividad de proliferación y migración de los HDF, lo que sugiere que SHED o SH-CM pueden usarse para el tratamiento del fotoenvejecimiento y la curación de heridas. Los resultados también sugieren que SHED es más adecuado para la curación de heridas dérmicas en comparación con las MSC, en términos de sus propiedades. Principalmente con factores de crecimiento secretados o proteínas ECM, SHED contribuye a mejorar el potencial de curación de heridas de HDF

Ejemplo 2

(1) Preparación de la mezcla del factor de crecimiento (polvo)

Se usaron células madre mesenquimales humanas inmortalizadas (MSC: Ronza Co., Ltd, EE. UU) Para preparar una mezcla de factor de crecimiento (GF). Las células se cultivaron durante 2 a 8 pases usando 10% de DMEM que contenía FSC. En un paso de 80% de confluencia de células en el plato de cultivo, se tomaron muestras del sobrenadante (medio de cultivo: CM). El CM muestreado se añadió luego a etanol (CM: etanol = 1:9) y se incubó a -20 °C durante 60 minutos. El CM se concentró por rotación (4 °C, 1500 rpm, 15 min). El CM restante se lavó con etanol al 90% a -20 °C, y luego se centrifugó nuevamente

El CM concentrado se liofilizó, obteniendo de ese modo un polvo de factor de crecimiento

(2) factores de crecimiento en el polvo

Cada factor de crecimiento en el polvo se analizó mediante el método de transferencia de Western. Los factores de crecimiento detectados son los siguientes: PDGF, VEGF, IGF, KGF, HGF y TGF

Ejemplo 3

Estudio experimental de la regeneración ósea por factor de crecimiento

(1) Métodos

Se formaron cuatro defectos óseos en forma de cilindro, cada uno con un diámetro de 10 mm y una profundidad de 10 mm, en la mandíbula del perro.

Se insertó un implante de titanio (3.75 mm de diámetro) en el centro de cada defecto.

Los espacios alrededor del implante se rellenaron con materiales de injerto, como (1) PRP, (2) 100% GF, (3) MSC (1 x 1,000,000) y (4) defecto vacío (control) (Fig. 10)

(2) Resultados

Ocho semanas después, el perro fue sacrificado y la mandíbula con los implantes fue disecada. Se realizó una muestra histológica y se calculó el BIC (hueso - contacto de implante) usando un microscopio óptico y un sistema de análisis de imágenes (Fig. 11)

* BIC = longitud total del contacto óseo con la superficie del implante/longitud total de la superficie del implante x 100 (%)

No hubo diferencias significativas en BIC entre MSC (65.0) y GF (58.6), y los respectivos valores de BIC en MSC y GF fueron mucho más altos que los del control (26.4) y PRP (44.2) (Figuras 12 y 13)

(3) Conclusión

En conclusión, los factores de crecimiento derivados de una célula madre mesenquimal tienen capacidades similares a una célula madre viva con respecto a la regeneración ósea.

Caso clínico: Varón de 56 años

El procedimiento de elevación sinusal con la instalación de dos implantes se realizó en una región post molar en maxilar superior. Un GF 100% basado en células con gránulos de b-TCP (β-fosfato tricálcico) se injertó en la cavidad sinusal. Ocho semanas después, la porción injertada se llenó con éxito con hueso nuevo, y la osteointegración entre los implantes y el hueso se confirmó mediante observación con rayos X (figuras 14 y 15)

Ejemplo 4

Estudio experimental de la regeneración tisular periodontal por factor de crecimiento

(1) Métodos

5 Se realizó un defecto periodontal de dos paredes en la poción distal de los molares en la mandíbula del perro (Figura 16). El defecto en cada perro se trató con el siguiente método o procedimiento (Figuras 17 y 18)

1) Operación de la aleta (FO, Control)

10 2) Método GTR

3) MSC (1 x 100,000)

15 4) GF (100%)

(2) Resultados

20 A las 8 semanas después de la cirugía, se disecó la mandíbula del perro con dientes molares y encía, y se realizó una muestra histológica de la misma. Por la observación histológica, la profundidad del bolsillo (N₁-JE, longitud del crecimiento del epitelio hacia abajo) y la longitud del nuevo cemento (N₂-NC) se evaluaron usando un microscopio óptico (Fig. 19). Estos parámetros fueron útiles para la evaluación de la mejoría de la enfermedad periodontal. La longitud del nuevo cemento fue mucho más larga en GF y MSC que en GTR y el control. Además, los grupos GF y MSC mostraron una mejora notable en la profundidad del bolsillo, en comparación con los grupos GTR y control (Figuras 20 a 22).

(3) Conclusión

El factor de crecimiento derivado del MSC tiene una capacidad similar a la del MSC en términos de regeneración del tejido periodontal.

30 Reporte de un caso: Mujer de 64 años

La porción media del canino inferior derecho tenía un defecto periodontal profundo que tenía una profundidad de 7 mm. La esponja aterocolágeno con 100% de GF se llenó en el defecto (Figuras 23 y 24). Dieciséis semanas más tarde, el defecto parecía estar clínicamente reparado con un tejido periodontal recién formado (Fig. 25).

35 Como se describió anteriormente, las terapias con citocinas tienen una ventaja sobre las terapias con células madre en términos de seguridad, estabilidad, fácil manipulación, fácil conservación, fácil transporte y bajo costo.

Ejemplo 5

40 Confirmación de efectos terapéuticos en el infarto cerebral

Modelo de isquemia cerebral

45 Todos los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (Facultad de Medicina de la Universidad de Nagoya). Se usaron ratas Sprague Dawley macho adultas (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japón) con un peso de 300-400 g. Los animales se anestesiaron inicialmente con isoflurano al 5% (Abbott Laboratories, North Chicago) y se mantuvieron bajo anestesia con isoflurano al 1.5% en una mezcla de 70% de N₂O y 30% de O₂. Su temperatura rectal se mantuvo a 37°C ± 0.5°C en una almohadilla térmica. La isquemia cerebral focal fue inducida por isquemia cerebral focal permanente (pMCHO) (día 0) (Fig. 26). Se avanzó una sutura de nylon monofilamento 4-0 (Shirakawa, Tokio, Japón) con la punta redondeada por calentamiento de llama y silicona (KE-200, Shin-Etsu Chemical, Tokio, Japón) desde la arteria carótida externa hacia la arteria carótida interna hasta que bloqueó el origen de la MCA. El flujo sanguíneo cerebral regional del territorio MCA se midió utilizando un medidor de flujo láser-Doppler (Omega FLO-N1: Omega Wave Inc, Tokio, Japón) después de la oclusión. La respuesta se consideró positiva e incluida solo si la reducción en el flujo sanguíneo cerebral regional fue mayor al 70%.

Administración intranasal de SH-CM

60 Setenta y dos horas después de pMCAO (día 3), las ratas se anestesiaron nuevamente con isoflurano al 5% (Abbott Laboratories, North Chicago) y se mantuvieron bajo anestesia con isoflurano al 1.5% en una mezcla de 70% de N₂O y 30% de O₂. Su temperatura rectal se mantuvo a 37°C ± 0.5°C en una almohadilla térmica. Los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos, se les administró medio acondicionado derivado de SHED (SH-CM) por vía intranasal (n=1, día 16 sacrificado = 1) (grupo I) o solución salina tamponada con fosfato (PBS) por vía intranasal (n=1, día16 sacrificado = 1) (grupo II) u operación pMCAO solamente (n=5, día16 sacrificado = 5) (grupo III). SH-CM, que se había preparado de la misma manera que en el Ejemplo 1, se usó en este experimento. Las ratas se colocaron sobre sus espaldas, su cuello se elevó con una gasa enrollada de 4 cm x 4 cm, y se administró un total de 100 µl por rata en la vía olfatoria utilizando

una microjeringa Hamilton, 10 µl a la vez, alternando las fosas nasales, con un intervalo de 2 min. entre cada administración. Durante estos procedimientos, se cerraron la boca y la fosa nasal opuesta. La administración intranasal se realizó todos los días durante un período del día 3 al día 15.

5 Evaluación de discapacidad motora

Se realizó una prueba a ciegas en las ratas los días 1, 3, 6, 9, 12 y 15 usando una escala de discapacidad motora estandarizada con ligeras modificaciones. La rata recibió 1 punto por cada uno de los siguientes parámetros: flexión de la extremidad anterior contralateral al golpe cuando se colgó instantáneamente por la cola; extensión de la extremidad posterior contralateral cuando se saca de la mesa; y la rotación hacia el lado parético contra la resistencia. Además, se asignó 1 punto para mover el círculo al lado parético cuando se intenta caminar, se otorgó 1 punto por no salir de un círculo de 50 cm de diámetro en 10 segundos, se otorgaron 2 puntos por no abandonar el círculo dentro de 20 segundos, y se anotaron 3 puntos por inhabilidad de salir del círculo dentro de los 60 segundos. Además, se dio 1 punto cada uno por la incapacidad de la rata para extender la pata delantera parética cuando se empuja contra la mesa desde arriba, lateralmente o hacia los lados. La evaluación según la escala de discapacidad motora se realizó 3 veces por punto de tiempo animal.

Evaluación del volumen del infarto

Los criosecciones obtenidas de las muestras el día 16 se tiñeron con Hematoxilina y Eosina. Se utilizó la Imagen J (Institutos Nacionales de Salud, ML) para determinar cada área de infarto en 20 secciones coronales (20 mm de espesor) a intervalos de 1.00 mm. Toda el área del infarto estaba cubierta por estas 12 secciones coronales. Los volúmenes regionales de infarto se calcularon sumando las áreas de infarto y multiplicando estas áreas por la distancia entre las secciones (1.00 mm), seguido de la corrección del edema cerebral.

Resultados

Evaluación de la función motora

Todos los grupos (grupo I, grupo II y grupo III) mostraron puntajes altos para la función motora en el paso temprano (los puntajes en el día 1 fueron 8, 9 y 8.2 ± 0.45 , respectivamente, y los puntajes en el día 3 fueron 8, 9 y 8.6 ± 0.89 , respectivamente). 6 días después, el alivio progresivo en la discapacidad motora en el grupo I en el día 6 se volvió significativo en comparación con los grupos II y III ($6, 9$ y 8.2 ± 0.84 , respectivamente), y más significativo en el día 9 en comparación con los grupos II y III ($5, 8$ y 8.8 ± 1.0 , respectivamente) (Fig. 27). Se observó una mejora persistente en el grupo I el día 12 (4) y el día 15 (3), mientras que se observó deterioro persistente debido a discapacidad motriz (puntuaciones superiores a 8) en los grupos II y III el día 15 (9 y 8.25 ± 0.96 , respectivamente).

Reducción del volumen de infarto

Hubo una disminución significativa en el volumen de infarto en el día 16 en el grupo I (día 16, 54.3 mm^3 $n=1$), en comparación con los grupos II y III (día 16, 192.7 mm^3 , $n=1$; día 16, 222.7 mm^3 , $n=1$) (Fig. 28). Estos resultados sugieren que la administración intranasal de SH-CM promovió la regeneración.

Como se describió anteriormente, se encontró que la terapia con citocinas tiene un excelente efecto restaurador hacia las áreas del infarto cerebral y es útil para el tratamiento del infarto cerebral. Resultados similares también fueron confirmados en otras ratas.

También se encontró que la selección de la administración intranasal para la terapia con citocinas proporciona menos invasividad y ejerce un efecto directo sobre las regiones isquémicas después de pasar la barrera hematoencefálica. Además, dado que se considera que el medio acondicionado con células madre de dientes deciduos contiene diversos factores nutricionales, se espera una restauración más rápida en comparación con la administración única de un factor nutricional.

Ejemplo 6

1. Preparación del medio acondicionado a partir de células madre de pulpa dental

Los medios acondicionados de las células madre de la pulpa dental (SHED y DPSC) se prepararon de acuerdo con el siguiente procedimiento (ver, Fig. 29), y se usaron en un experimento para verificar el efecto de regeneración nerviosa.

(i) Cultivar células madre de pulpa dental en un medio que contiene suero (10% de SFB) a 37°C con 5% de CO_2 hasta que las células en la placa de cultivo alcancen del 70% al 80% de confluencia.

(ii) Cuando alcance una confluencia del 70% al 80%, lave la placa de cultivo dos veces con PBS y reemplace el medio con un medio libre de suero (0% de FBS).

(iii) Cultivar a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 horas.

(iv) Después de 48 horas de cultivo, recoger el medio libre de suero en un tubo de centrifugación

5 (v) Centrifugar el medio sin suero recogido a 1.500 rpm durante 4 a 5 minutos para precipitar las impurezas, tal como las células muertas

10 (vi) Transferir el sobrenadante del tubo de centrifugación centrifugado a otro tubo de centrifugación sin prestar atención a las impurezas de succión

(vii) Centrifugar adicionalmente el sobrenadante recogido a 4°C y 15.000 rpm durante 1 minuto para precipitar las impurezas de nuevo

15 (viii) Transferir de nuevo el sobrenadante desde el tubo de centrifugación centrifugado a otro tubo de centrifugación mientras no presta atención, a las impurezas de succión

(ix), para obtener el sobrenadante resultante, que sirve como medio acondicionado por células madre de pulpa dental.

20 2. Células neuronales utilizadas para el análisis *in vitro*

Las células PC12, una línea celular derivada de un feocromocitoma suprarrenal de rata inmortalizada, se usaron como células neuronales. Se sabe que la adición del factor de crecimiento nervioso (NGF), uno de los factores neurotróficos, a las células PC 12 induce la excrecencia de procesos similares a axones y la diferenciación en células de tipo neuronal. Por lo tanto, las células PC12 se usan como células modelo para diversos experimentos *in vitro* en el sistema nervioso.

25 3. Efecto de la excrecencia de neurita y la inhibición de la apoptosis del medio condicionado por células madre de la pulpa dental

30 (Experimento de excrecencia de neurita y experimento de inducción de apoptosis usando sustancias inhibidoras de la regeneración nerviosa)

El efecto de la excrecencia de las neuritas y el efecto inhibidor de la apoptosis del medio acondicionado de células madre de la pulpa dental se examinaron en presencia o ausencia de una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa (factor inhibidor de la excrecencia de las neuritas). CSPG y MAG se usaron como sustancias inhibidoras de la regeneración nerviosa. El protocolo del experimento es como se describe a continuación.

(1) Experimento de excrecencia de neurita

40 (i) Cubrir una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa (CSPG o MAG) en un pozo de cultivo celular (revestido con poli-L-lisina).a 37°C durante 24 horas

45 (ii) Sembrar células PC12 en las placas recubiertas con la sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa, y cultivarlas con el medio acondicionado por células madre de la pulpa dental durante 24 horas. Como grupos comparativos, se usan un medio sin suero, un medio acondicionado con fibroblastos y un medio acondicionado con células madre mesenquimales de médula ósea.

(iii) Evaluar la excrecencia de neuritas de las células PC 12 basándose en una micrografía de contraste de fase de las mismas.

50 (2) Experimento de inducción de apoptosis

Las células P12 se siembran en las placas recubiertas con la sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa, y se cultivan con el medio acondicionado por células madre de la pulpa dental durante 24 horas. La apoptosis de las células se evaluó según el ensayo TUNEL. Se usa un medio sin suero, un medio acondicionado con fibroblastos y un medio acondicionado con células madre mesenquimales de médula ósea como grupos comparativos.

60 En las placas recubiertas con sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa (CSPG, MAG), el medio acondicionado de células madre de la pulpa dental exhibió un efecto de excrecencia de neurita más fuerte (Figuras 30 a 33) y efecto inhibidor de la apoptosis (Figuras 34 y 35) en comparación con otros grupos (grupos comparativos). El medio acondicionado por células madre de pulpa dental exhibió un fuerte efecto de excrecencia de neurita, incluso sin la adición de NGF, que es esencial para que las células PC 12 se diferencien en células similares a neuronas (es decir, el medio acondicionado por células madre de pulpa dental exhibió un efecto de excrecencia de neurita fuerte por sí mismo).

65 Es decir, como se muestra en la Fig. 30, cultivar PC12 células similares a neuronas con el medio acondicionado por células madre de pulpa dental (durante 24 horas) da como resultado la excrecencia de neuritas (es decir, el medio acondicionado por células madre de pulpa dental muestra actividad de excrecencia de neuritas), incluso en el plato

recubierto con una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa CSPG (ver Fig. 30). La adición del medio condicionado de células madre mesenquimales de médula ósea o el medio acondicionado por fibroblastos derivado de piel solo, o la adición de Y27632 solo, que inhibe la activación de ROCK, no muestra dicha actividad de excrecencia.

5 Como se muestra en la Fig. 31, el medio acondicionado por células madre de pulpa dental aumenta la proporción de células que exhiben excrecencia de neuritas, y promueve la formación de neuritas más largas, incluso en condiciones en las que está presente una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa CSPG.

10 Como se muestra en la Fig. 32, cultivar células similares a neuronas PC12 con el medio acondicionado por células madre de pulpa dental (durante 24 horas) da como resultado la excrecencia de neuritas (es decir, el medio acondicionado por células madre de pulpa dental muestra actividad de excrecencia de neuritas), incluso en el plato cubierto con una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa MAG. La adición del medio acondicionado con células madre mesenquimales de médula ósea o el medio acondicionado con fibroblastos dérmicos solo, o la adición de Y27632 solo, que inhibe la activación de ROCK, no muestra dicha actividad de excrecencia.

15 Como se muestra en la figura 33, el medio acondicionado por células madre de pulpa dental aumenta la proporción de células que exhiben excrecencia de neuritas, y promueve la formación de neuritas más largas, incluso en condiciones en las que está presente una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa MAG.

20 Como se muestra en las Figs. 34 y 35, casi todas las células similares a neuronas PC12 cultivadas durante 24 horas en el plato recubierto con una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa MAG o CSPG sufrieron apoptosis. El medio acondicionado por células madre de pulpa dental inhibe casi perfectamente la apoptosis del mismo.

25 Los símbolos en la Fig. 30 representan lo siguiente: PLL: capa de poli-L-lisina, PLL+NGF: capa de poli-L-lisina y adición de factor de crecimiento nervioso (NGF), PLL/CSPG: capa de poli-L-lisina y capa CSPG, PLL/CSPG Y27632: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y adición de Y27632, PLL/CSPG SHED-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y cultivar con medio acondicionado SHED, PLL/CSPG DPSC -CM: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG y cultivar con medio acondicionado DPSC, PLL/CSPG BMSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG y cultivar con medio acondicionado con célula madre mesenquimal de médula ósea, PLL/CSPG Fibro-CM: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG y cultivar con medio acondicionado con fibroblastos.

30 Los símbolos en la Fig. 31 representan lo siguiente: PLL: capa de poli-L-lisina, PLL+NGF: capa de poli-L-lisina y adición de factor de crecimiento nervioso (NGF), PLL/CSPG: capa de poli-L-lisina y capa CSPG, PLL/CSPG+NGF: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y adición de NGF, PLL/CSPG+SHED-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y cultivar con medio acondicionado SHED, PLL/CSPG+NGF+SHED-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG, adición de NGF y cultivar con medio acondicionado SHED, PLL/CSPG+DPSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y cultivar con medio acondicionado con DPSC, PLL/CSPG+NGF+DPSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG, adición de NGF y cultivar con medio acondicionado DPSC, PLL/CSPG+BMSC-CM: capa de poli-L-lisina, Capa de CSPG y cultivar con medio acondicionado con célula madre mesenquimal de médula ósea, PLL/CSPG+NGF+BMSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG, adición de NGF y cultivar con medio acondicionado con célula madre mesenquimal de médula ósea, PLL/CSPG+Fibro-CM: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG y cultivar con medio acondicionado con fibroblasto PLL/CSPG+NGF+Fibro-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG, adición de NGF y cultivar con medio acondicionado con fibroblastos, PLL/CSPG+Y27632: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y adición de Y27632, PLL/CSPG+NGF+Y27632: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG, adición de NGF y adición de Y27632.

35 Los símbolos en la Fig. 32 representan lo siguiente: PLL: capa de poli-L-lisina, PLL+NGF: capa de poli-L-lisina y adición de factor de crecimiento nervioso (NGF), PLL/MAG: capa de poli-L-lisina y capa MAG, PLL/MAG Y27632: capa de poli-L-lisina, capa MAG y adición de Y27632, PLL/MAG SHED-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado SHED, PLL/MAG DPSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado DPSC, PLL/MAG BMSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado con célula madre mesenquimatoso de medula ósea, PLL/MAG Fibro-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado con fibroblastos.

40 Los símbolos en la Fig. 33 representan lo siguiente: PLL: capa de poli-L-lisina, PLL+NGF: capa de poli-L-lisina y adición de factor de crecimiento nervioso (NGF), PLL/MAG: capa de poli-L-lisina y capa MAG, PLL/MAG+NGF: capa de poli-L-lisina, capa MAG y adición de NGF, PLL/MAG+SHED-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado SHED, PLL/MAG+NGF+SHED-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG, adición de NGF y cultivar con medio acondicionado SHED, PLL/MAG+DPSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado DPSC, PLL/MAG+NGF+DPSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG, adición de NGF y cultivar con medio acondicionado DPSC, PLL/MAG+BMSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado con célula madre mesenquimal de medula ósea, PLL/MAG+NGF+BMSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG, adición de NGF y cultivar con medio acondicionado con celula madre mesenquimal de medula osea, PLL/MAG+Fibro-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado con fibroblastos, PLL/MAG+NGF+Fibro-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG, adición de NGF y cultivar con medio acondicionado con fibroblastos, PLL/MAG+Y27632: capa de poli-L-lisina, capa MAG y adición de Y27632, PLL/MAG+NGF+Y27632: capa de poli-L-lisina, capa MAG, adición de NGF y adición de Y27632.

Los símbolos en la Fig. 34 representan lo siguiente: PLL: capa de poli-L-lisina, PLL/CSPG: capa de poli-L-lisina y capa CSPG, PLL/CSPG SHED-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y cultivar con medio acondicionado SHED, PLL/CSPG DPSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y cultivar con medio acondicionado DPSC, PLL/CSPG BMSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y cultivar con medio acondicionado con célula madre mesenquimal de médula ósea, PLL/CSPG Fibro-CM: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG y cultivar con medio acondicionado con fibroblastos, PLL/CSPG+Y27632: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG y adición de Y27632, PLL: capa de poli-L-lisina, PLL/MAG: capa de poli-L-lisina y capa MAG, PLL/MAG SHED-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado SHED, PLL/MAG DPSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado DPSC, PLL/MAG BMSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado con célula madre mesenquimal de médula ósea, PLL/MAG Fibro-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado con fibroblastos, PLL/MAG Y27632: capa de poli-L-lisina, capa MAG y adición de Y27632.

Los símbolos en la Fig. 35 representan lo siguiente: PLL: capa de poli-L-lisina, PLL/CSPG: capa de poli-L-lisina y capa CSPG, PLL/CSPG SHED-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y cultivar con medio acondicionado SHED, PLL/CSPG DPSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y cultivar con medio acondicionado DPSC, PLL/CSPG BMSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa CSPG y cultivar con medio acondicionado de célula madre mesenquimal de médula ósea, PLL/CSPG Fibro-CM: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG y cultivar con medio acondicionado con fibroblastos, PLL/CSPG+Y27632: capa de poli-L-lisina, capa de CSPG y adición de Y27632, PLL: capa de poli-L-lisina, PLL/MAG: capa de poli-L-lisina y capa MAG, PLL/MAG SHED-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado SHED, PLL/MAG DPSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado DPSC, PLL/MAG BMSC-CM: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado con célula madre mesenquimal de médula ósea, PLL/MAG fibro-cm: capa de poli-L-lisina, capa MAG y cultivar con medio acondicionado con fibroblastos, PLL/MAG Y27632: capa de poli-L-lisina, capa MAG y adición de Y27632.

Como se describió anteriormente, se reveló un hecho sorprendente de que el medio acondicionado con células madre de pulpa dental suprime la acción de las sustancias inhibitoras de la regeneración nerviosa, promueve la excrecencia de neuritas y suprime la apoptosis. En otras palabras, se reveló que el medio acondicionado por células madre de la pulpa dental es bastante efectivo para la regeneración del SNC y el tratamiento de enfermedades del SNC.

4. Verificación utilizando animales modelo lesionados de médula espinal

(1) Mejora de la función motora de los miembros traseros por administración de medio acondicionado

La 10ª vértebra torácica se extrajo de ratas SD hembra de 8 semanas de edad bajo anestesia general con pentobarbital sódico, y se indujo daño por aplastamiento aplicando una fuerza de 200 kilodina desde el exterior de la duramadre usando un impactador IH, para obtener un modelo de lesión por aplastamiento de médula espinal. Desde inmediatamente después de la lesión por aplastamiento, un tubo de silicona conectado a una bomba de microinfusión perfectamente implantable en la que el medio acondicionado de células madre de pulpa dental (SHED-CM), un medio acondicionado con célula madre mesenquimal con médula ósea (BMSC-CM) o PBS (control) se cargó, se insertó desde la cavidad subaracnoidea debajo de la vértebra torácica duodécima y se colocó para permitir el flujo de salida directamente sobre el sitio de la lesión. La administración se llevó a cabo continuamente a un caudal de 24 µl/día durante 8 semanas hasta que las ratas se sacrificaron, y se evaluó la función motora de los miembros posteriores cada semana. El puntaje de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) (Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. J. Neurotrauma., 1995: 12: 1-21). Se utilizó para la evaluación.

Puntaje BBB

0. Ningún movimiento observable de la articulación de la cadera, la articulación de la rodilla y la articulación del pie en absoluto.

1. Leve movimiento de una o dos articulaciones.

2. Movimiento extenso de una sola articulación.

3. Movimiento extenso de dos articulaciones solamente

4. Leve movimiento de las tres articulaciones.

5. Ligero movimiento de dos articulaciones y amplio movimiento de la articulación restante.

6. Movimiento extenso de dos articulaciones y ligero movimiento de la articulación restante.

7. Movimiento extenso de las tres articulaciones.

8. Barrido sin soporte de peso, o colocación plantar de la pata sin soporte de peso

9. Barrido o pisadas muy ocasionales con soporte de peso por las extremidades posteriores
10. Pasos ocasionales (5% a 50%) soportados en peso y sin coordinación de la extremidad anterior con la extremidad posterior
- 5 11. Pasos frecuentes (50% a 100%) soportados en peso y sin coordinación de la extremidad anterior-extremidad posterior
12. Pasos ocasionales (5% a 50%) soportados en peso y coordinación ocasional (5% a 50%) de la extremidad anterior y la extremidad posterior
- 10 13. Pasos frecuentes (50% a 100%) soportados en peso y coordinación frecuente (50% a 100%) entre la extremidad anterior y la extremidad posterior
- 15 14. Pasos frecuentes plantares soportados en peso con coordinación de la extremidad anterior-extremidad posterior/pasos consistentes plantares soportados en peso con rotación externa de la posición de la pata (debido a la fuerza muscular débil).
- 20 15. Coordinación de la extremidad anterior-extremidad posterior, pasos ocasionales (5% a 50%) con elevación del talón y rotación externa de la posición de la pata
- 25 16. Coordinación de la extremidad anterior y la extremidad posterior, pasos frecuentes (50% a 100%) con levantamiento del talón y colocación paralela ocasional de la pata en el cuerpo
- 30 17. Coordinación de la extremidad anterior-extremidad posterior, pasos frecuentes (50% a 100%) con levantamiento del talón y colocación paralela de la pata en el cuerpo
- 35 18. Coordinación de la extremidad anterior-extremidad posterior, pasos con levantamiento de talón y colocación paralela de la pata en el cuerpo
- 40 19. Coordinación de la extremidad anterior-extremidad posterior, pasos con levantamiento del talón, colocación paralela de la pata en el cuerpo, la cola permanece hacia abajo
- 45 20. Coordinación de la extremidad anterior-extremidad posterior, pasos con levantamiento de talón, colocación paralela de la pata en el cuerpo y levantando la cola
21. Coordinación de la extremidad anterior-extremidad posterior, pasos con levantamiento de talón, colocación paralela de la pata en el cuerpo, levantamiento de la cola y soporte de peso.
- Los efectos atenuantes de la función motora de la extremidad posterior se compararon en base a los puntajes BBB. Los resultados de la evaluación se muestran en la Fig. 36. El grupo administrado con el medio acondicionado por células madre de pulpa dental (SHED-CM) exhibió una sorprendente mejoría y recuperación de la función motora de la extremidad posterior representada por el puntaje 15 (coordinación de la extremidad anterior-extremidad posterior, ocasionales (5% a 50%) con elevación del talón y rotación externa de la posición de la pata). Aunque el grupo se administró con el medio acondicionado con células madre mesenquimales de médula ósea (BMSC-CM) también exhibió un cierto grado de mejora, el efecto de mejora del mismo es mucho menor que el del grupo SHED-CM.

(2) Alteración de la morfología de la médula espinal después de 8 semanas

- 8 semanas después del inicio de la administración de SHEM-CM (o BMSC-CM o PBS), las ratas se fijaron por perfusión con paraformaldehído. Posteriormente, se diseccionó una longitud de la médula espinal que incluía el sitio de la lesión y se extendía 5 mm rostralmente y 5 mm caudalmente desde el sitio de la lesión, y se extrajo. Los pesos de las médulas espinales se compararon entre el grupo Sustituto, el grupo control, el grupo BMSC-CM y el grupo SHED-CM.

- Se evaluó la alteración morfológica de la médula espinal 8 semanas después del inicio de la administración. Los estados de las médulas espinales tomadas se muestran en el panel superior de la Fig. 37. La comparación de los pesos (masas) de las médulas espinales se muestra en el panel inferior de la Fig. 37. En el grupo tratado con SHED-CM, se suprimió la atrofia de la médula espinal caudal al sitio de la lesión (epicentro de la lesión) (el panel superior de la Fig. 37). En otras palabras, la administración de SHED-CM suprimió la alteración morfológica de la médula espinal lesionada. De acuerdo con este resultado, el grupo SHEM-CM también exhibió un aumento en el peso de la médula espinal (el panel inferior de la Fig. 37).

(3) Neuroaxis espinal después de 8 semanas

- 8 semanas después del inicio de la administración de SHEM-CM (o PBS), las ratas se fijaron por perfusión con paraformaldehído. Se disecó una longitud de la médula espinal que incluía el sitio de la lesión y se extendía 5 mm rostralmente y 5 mm caudalmente desde el sitio de la lesión, y se extrajo. Luego, la médula espinal se incrustó y se

congeló en el compuesto O.C.T., y se prepararon portaobjetos de sección congelada de la médula espinal. Los portaobjetos de la sección congelada de la médula espinal se inmunotñieron con un anticuerpo anti-serotonina (5-HT) y con un anticuerpo contra el neuroeje (anticuerpo anti-Neurofilamento-M (NF-M)).

- 5 La porción dañada y un vecindario de la misma se examinaron histológicamente 8 semanas después del inicio de la administración. Los resultados de la inmunotñición se muestran en la Fig. 38. La administración continua de una pequeña cantidad de SHED-CM mantuvo el número total de neurofilamentos (NF-M) en la región caudal al sitio de la lesión. El número de fibras de serotonina que se proyectan desde los núcleos de rafe del tronco cerebral hasta la médula espinal también se mantuvo. Se reveló que la pérdida de neurofilamentos se suprime con la administración de SHED-CM, y que
- 10 un neurotransmisor serotonina producido en las áreas superiores y el tronco encefálico se transportó a las áreas más bajas que el sitio de la lesión.

(4) Experimento sobre la supresión de la apoptosis por medio acondicionado

- 15 El grupo control y el grupo SHED-CM se fijaron por perfusión con paraformaldehído 24 horas después de la lesión por aplastamiento de la médula espinal y una semana después de la lesión por aplastamiento de la médula espinal. Se disecó una longitud de la médula espinal que incluía el sitio de la lesión y se extendía 5 mm rostralmente y 5 mm caudalmente desde el sitio de la lesión, y se extrajo. Luego, la médula espinal extraída se incrustó y se congeló en un compuesto de O.C.T. y se prepararon portaobjetos de sección congelada de la médula espinal. Los portaobjetos de sección congelada
- 20 de la médula espinal se inmunotñieron doblemente con TUNEL, que reacciona específicamente con ADN fragmentados, y un anticuerpo anti-GFAP específico para astrocitos, un anticuerpo anti-NeuN específico para células neuronales o un anticuerpo anti-CNPasa específico para oligodendrocitos, para comparar la muerte celular de células neuronales y células gliales.
- 25 La muerte celular de las células neuronales en la porción dañada y en su vecindad se evaluó 24 horas después de la lesión por aplastamiento de la médula espinal y una semana después de la lesión por aplastamiento de la médula espinal. Los resultados se muestran en la fig. 39. La administración continua de una pequeña cantidad de SHED-CM suprimió la muerte celular apoptótica de astrocitos, neuronas y oligodendrocitos que se produjo inmediatamente después de la lesión del nervio. En la lesión de la médula espinal, la muerte celular apoptótica de los oligodendrocitos se observa en un área más grande una semana después de la lesión (agrandamiento del daño secundario). Se reveló que SHED-CM también
- 30 suprime esta muerte celular apoptótica, suprimiendo así la ampliación del daño neuronal. Experto en la técnica.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de tratamiento de parte dañada que comprende un medio acondicionado con células madre obtenido cultivando células madre de pulpa dental para uso en el tratamiento del daño a la piel, tejido periodontal o hueso, tratamiento de infarto cerebral por administración intranasal o tratamiento de una lesión de médula espinal, en la que la composición de tratamiento de parte dañada no comprende las células madre de pulpa dental.
- 10 2. La composición de tratamiento de parte dañada para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el medio acondicionado con células madre comprende al menos dos citocinas.
- 15 3. La composición de tratamiento de parte dañada para su uso según la reivindicación 1 o 2, donde el medio acondicionado con células madre comprende al menos dos citocinas seleccionadas del grupo que consiste en factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor β de crecimiento transformante (TGF- β).
- 20 4. La composición de tratamiento de parte dañada para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que no comprende ningún suero.
- 25 5. Un método para producir la composición de tratamiento de partes dañadas de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo el método los siguientes pasos (1) a (4):
 - (1) un paso de selección de células adhesivas de células de pulpa dental;
 - (2) un paso de cultivar las células adhesivas;
 - (3) un paso de eliminar los componentes celulares por separación después de cultivar; y
 - (4) un paso de recolectar un medio acondicionado.
- 30 6. El método según la reivindicación 5, que comprende además el siguiente paso (5):
 - (5) un paso de someter el medio acondicionado recogido a al menos un tratamiento seleccionado del grupo que consiste en centrifugación, concentración, sustitución de disolvente, diálisis, congelación, secado, liofilización, dilución, desalinización y almacenamiento.
- 35 7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, que comprende además uno de los siguientes pasos (a) o (b):
 - (a) un paso de verificación del medio acondicionado recogido con respecto a la presencia o ausencia de una actividad de excrecencia de neurita en presencia de una sustancia inhibidora de la regeneración nerviosa; o
 - (b) un paso de verificación del medio acondicionado recogido con respecto a la presencia o ausencia de una actividad inhibidora de la apoptosis hacia las células neuronales.
- 40

FIG.1

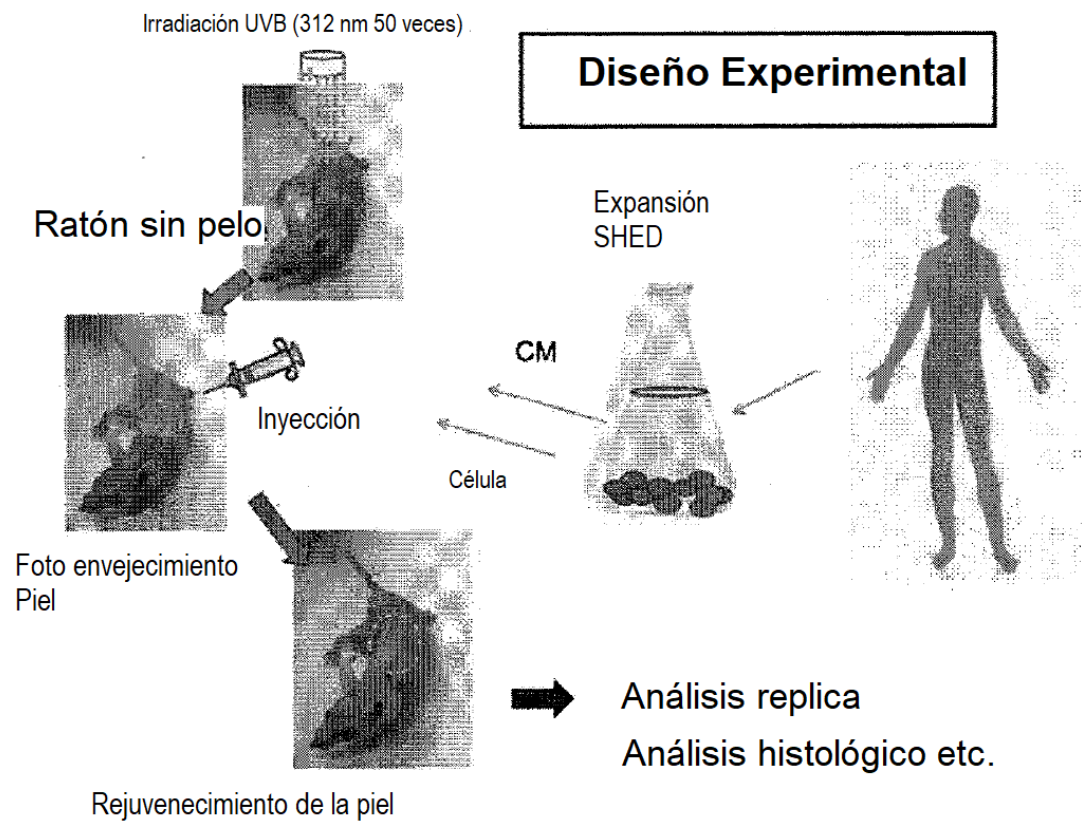


FIG.2

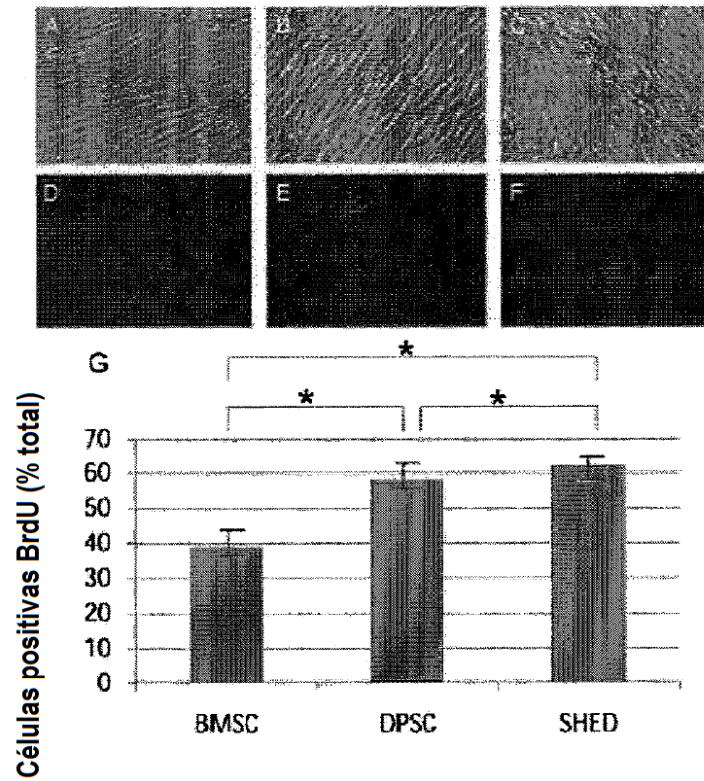


FIG.3

Análisis de réplica

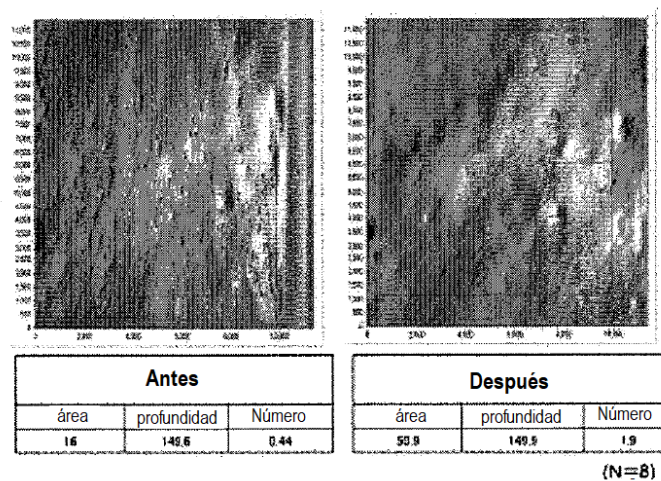


FIG.4

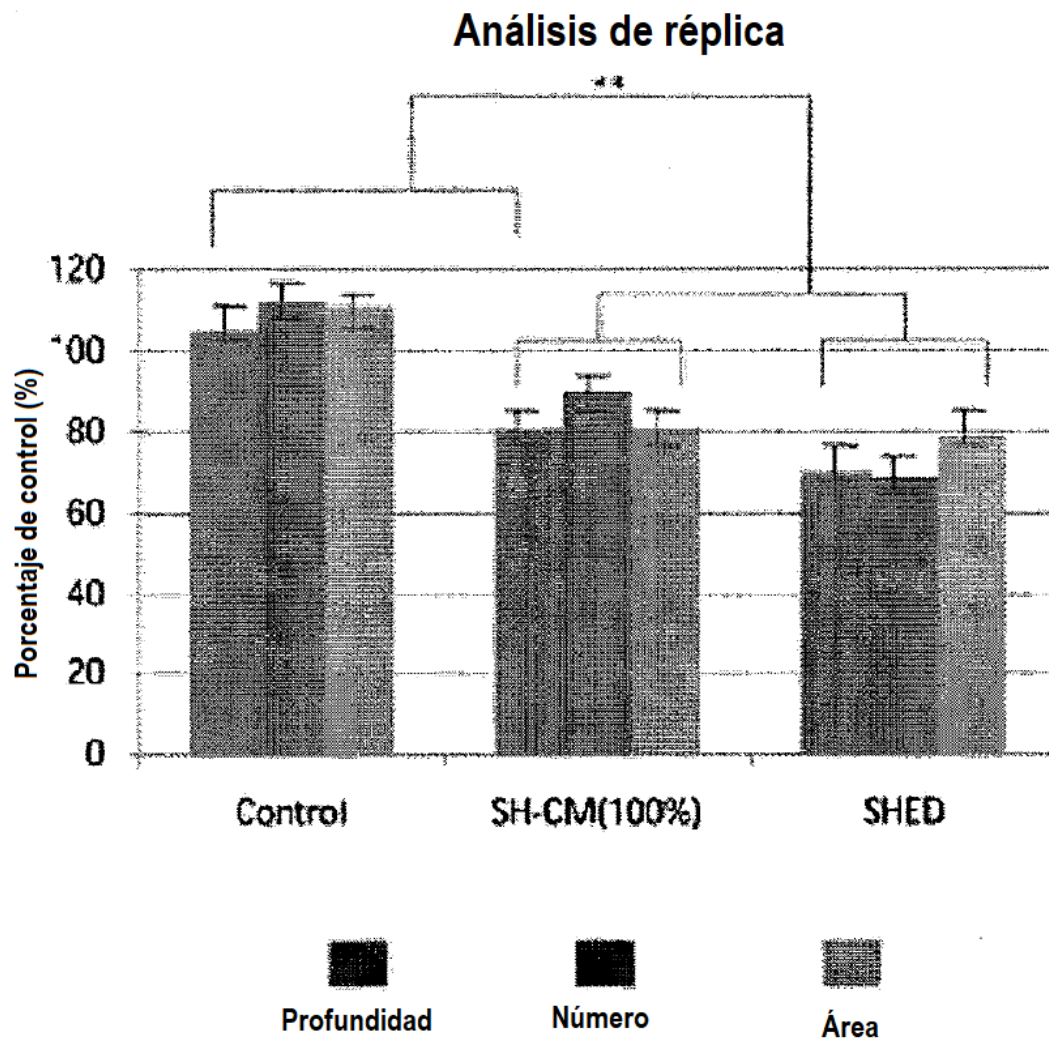


FIG.5

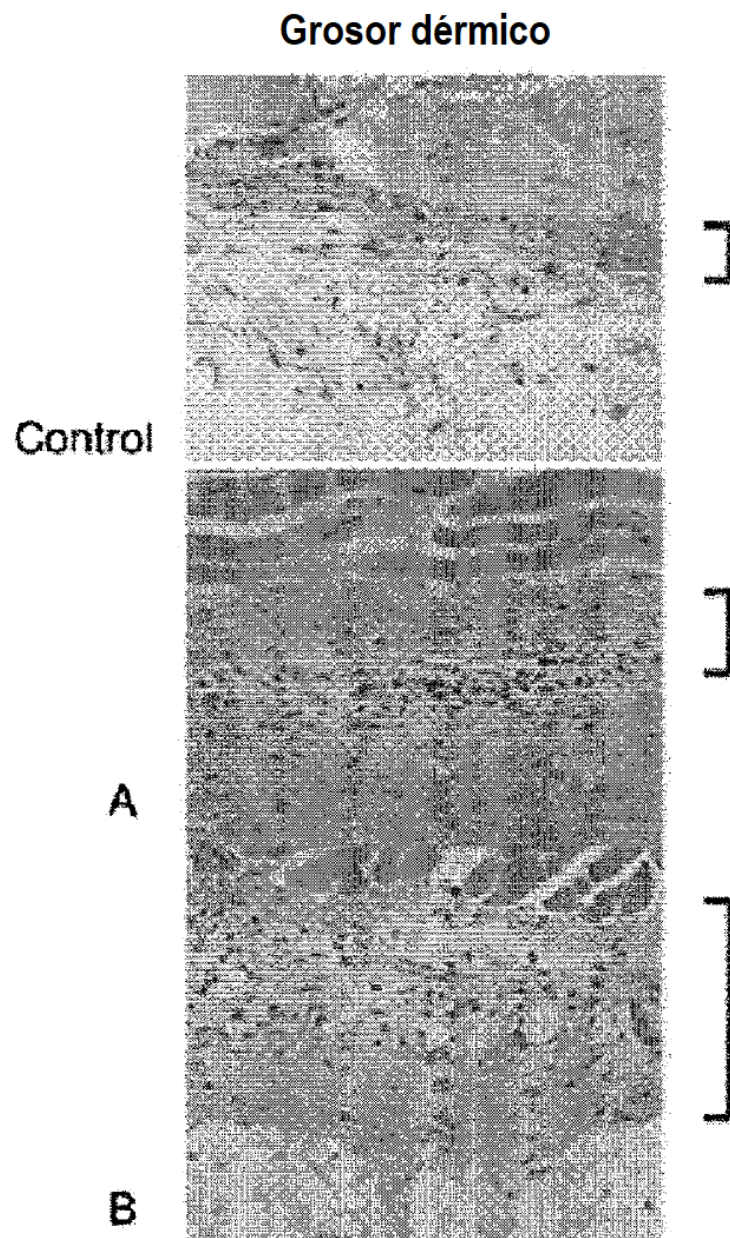


FIG.6

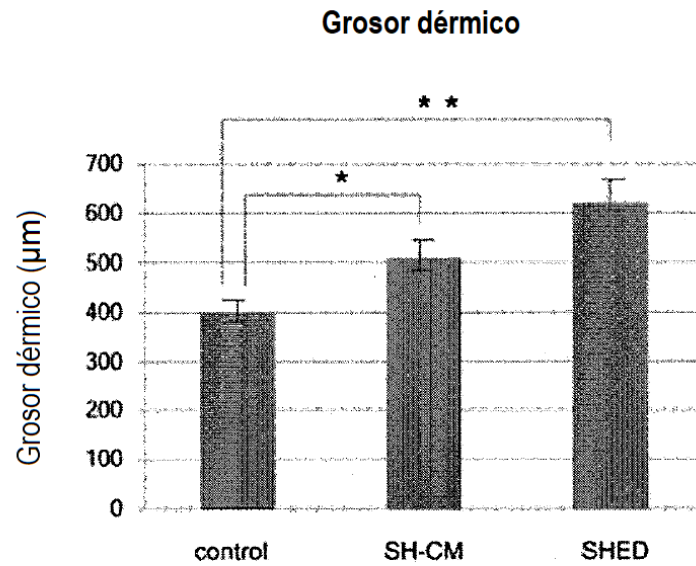


FIG.7

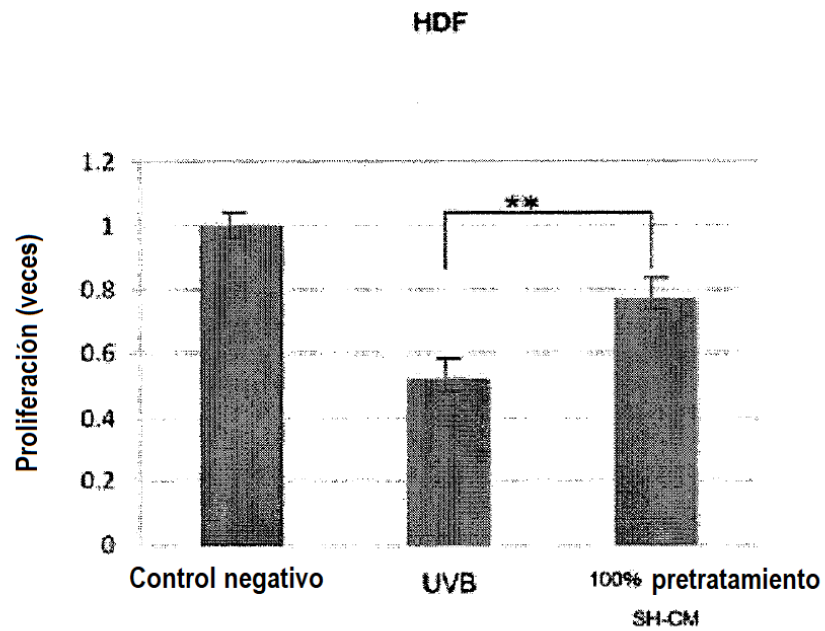


FIG.8

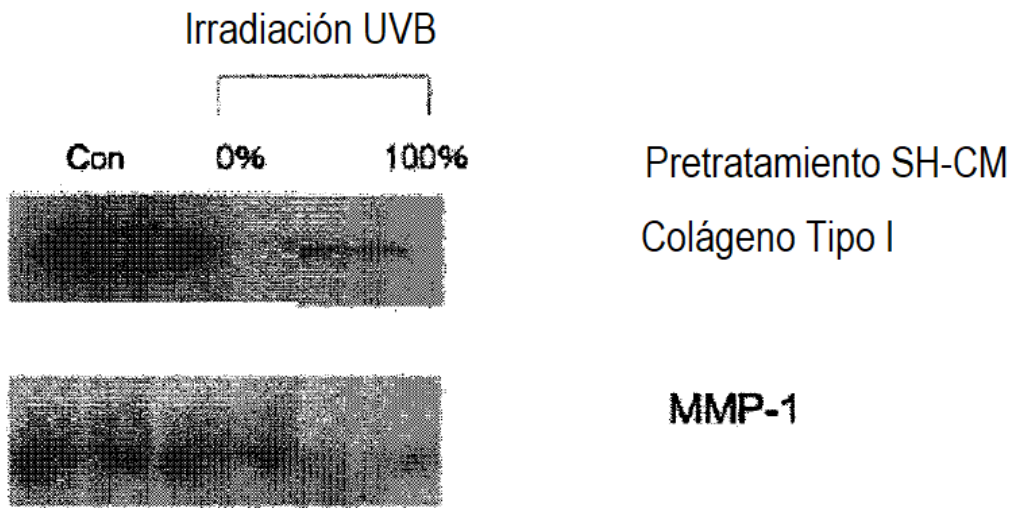


FIG.9

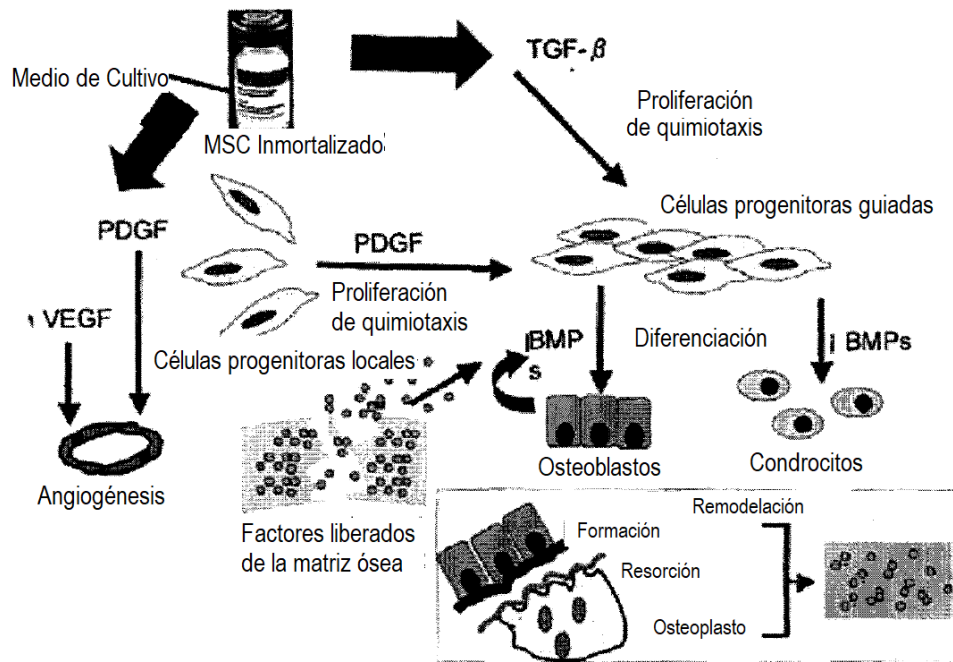


FIG.10

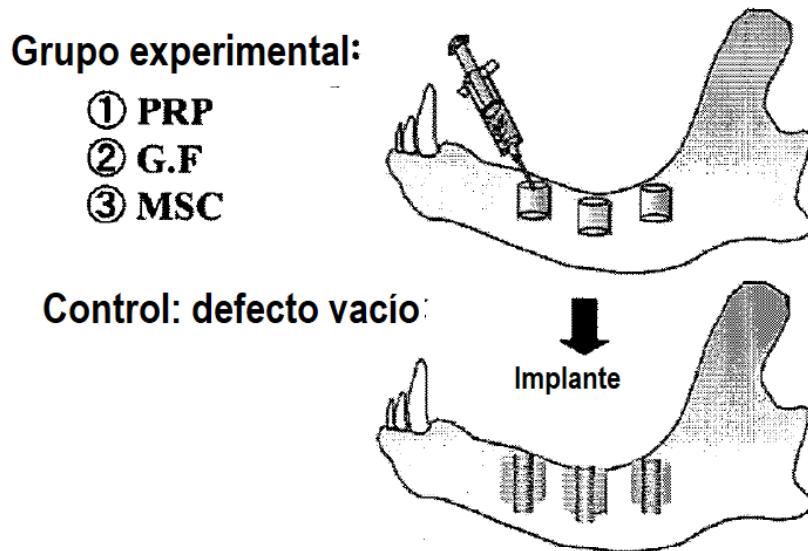
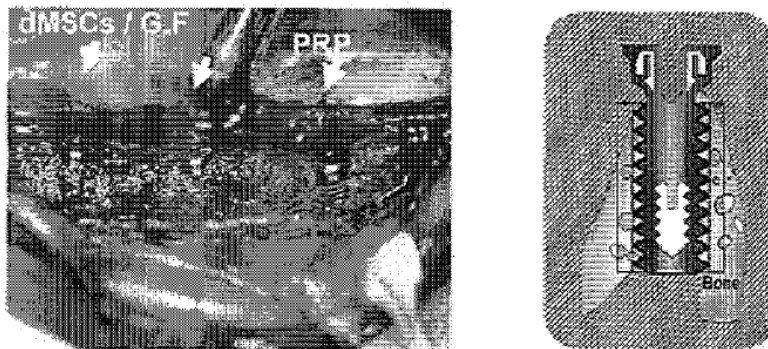


FIG.11



$$\text{BIC(\%)} = \frac{\text{Longitud total del contacto del hueso}}{\text{Longitud total de las superficies del implante}} \times 100$$

FIG.12

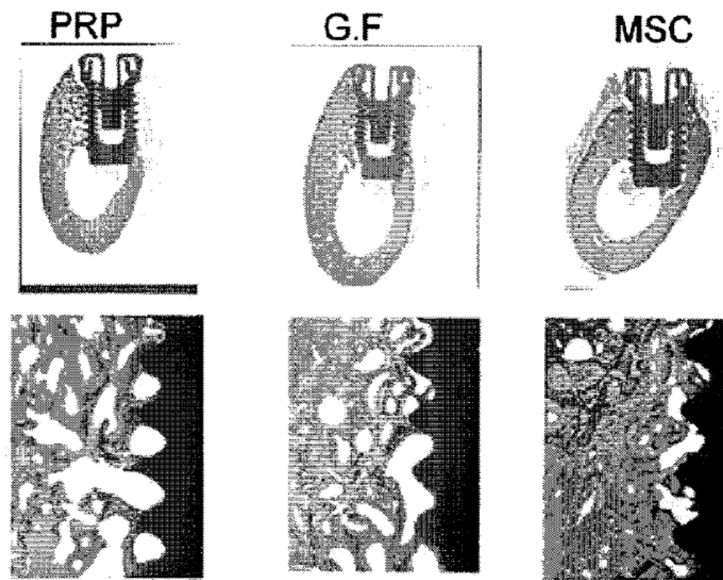


FIG.13

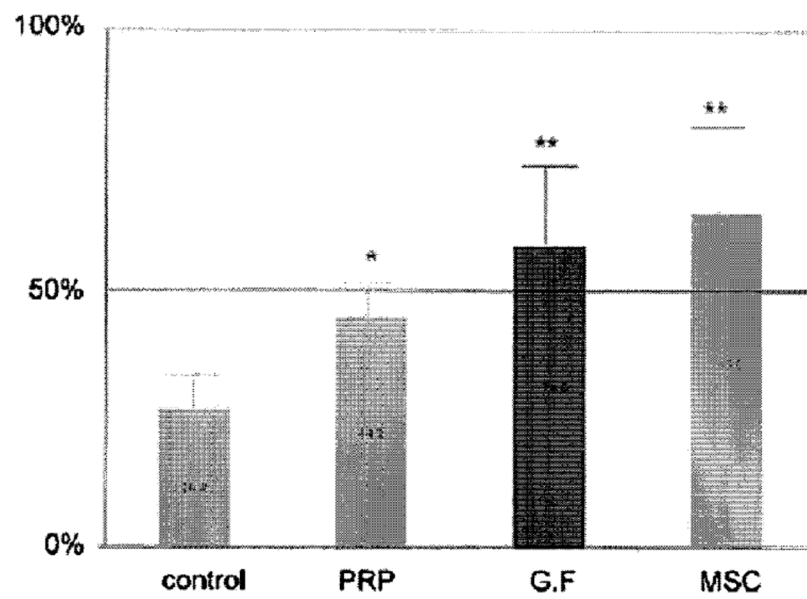


FIG.14

Caso 1. Macro vista

18W



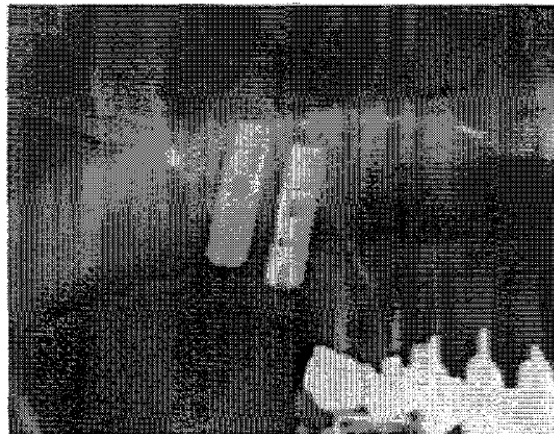
56,M

FIG.15

Caso 1

Vista panorámica

18W



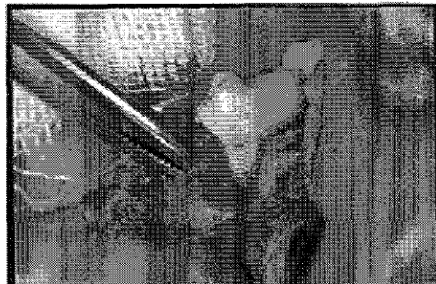
56,M

FIG.16

3 perros Beagle machos

(ca. 1 año de edad, ca. 15kgs)

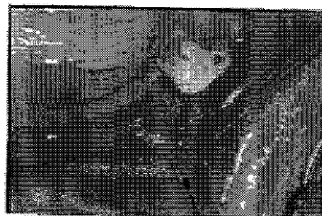
Extracción de M_1 y m_1



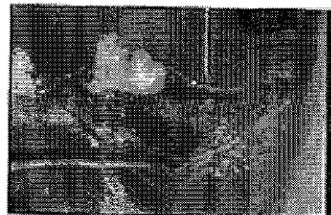
- 2 defectos óseos de la pared en los sitios mesiales de M_2S y en los sitios distales del PM_4S
5 mm (profundidad), 3 mm (ancho), 3 (longitud)
Llenar los defectos con materiales dentales con el fin de asegurar la infección bacteriana

FIG.17

1.F.O



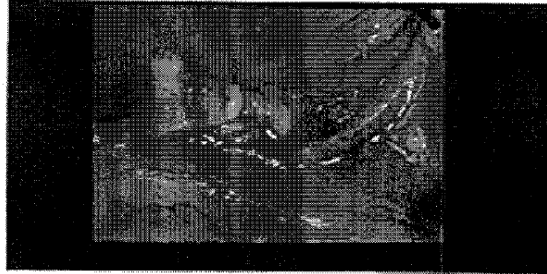
2.GTR



- Membrana periodontal bioabsorbible (GC membrana® GC, Tokio, Japón)
Ácido poliláctico-co-ácido glicólico (PLGA)
- Sutura Bioabsorbible (Vicril, Eticon, USA)

FIG.18

3. MSC



4. GF

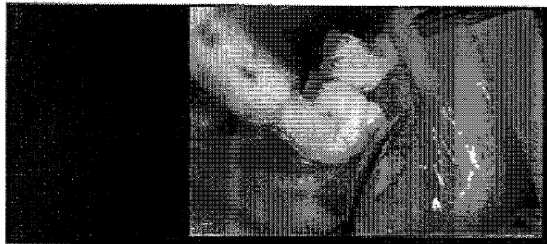


FIG.19

N₁ – JE: longitud del crecimiento bajo epitelial

N₂-NC: longitud de nuevo cemento

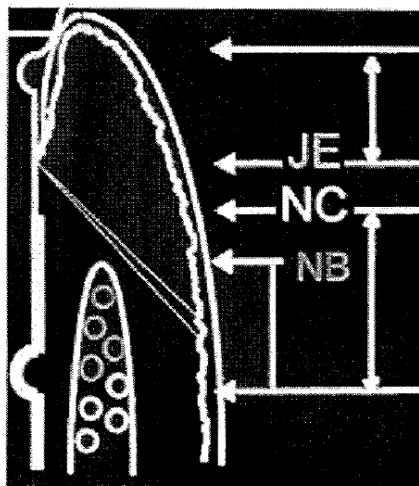


FIG.20

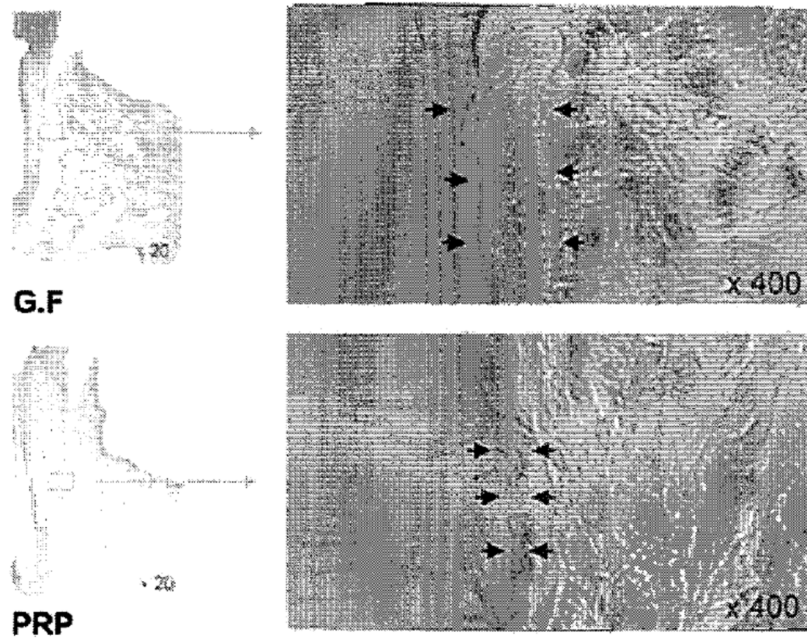


FIG.21

Mediciones histológicas

Medios %: relativo a la distancia de $N_1 - N_2$

Nuevo cemento

$N_2 - NC$

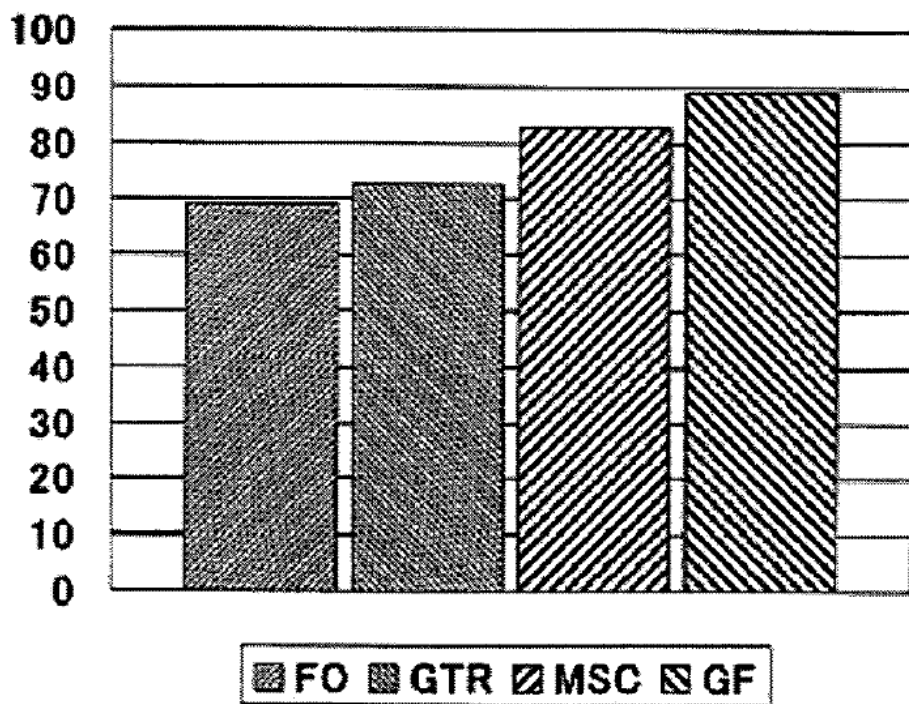


FIG.22

Mediciones histológicas

Medios %: relativo a la distancia de $N_1 - N_2$

Epitelio de unión
 $N_1 - JE$

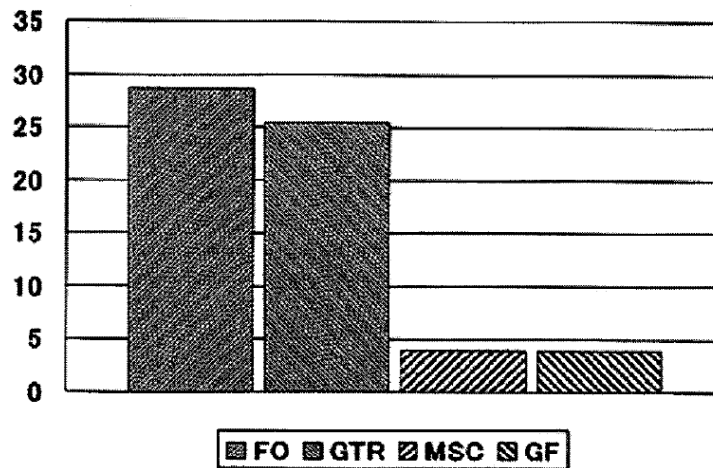


FIG.23

Pretratamiento



FIG.24

G.F + esponja de colágeno

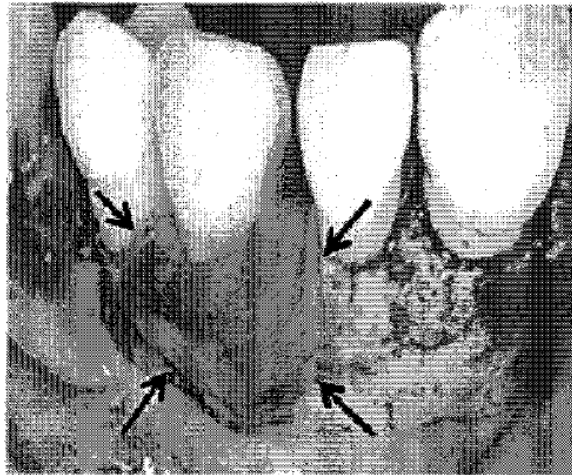


FIG.25

16w



FIG.26

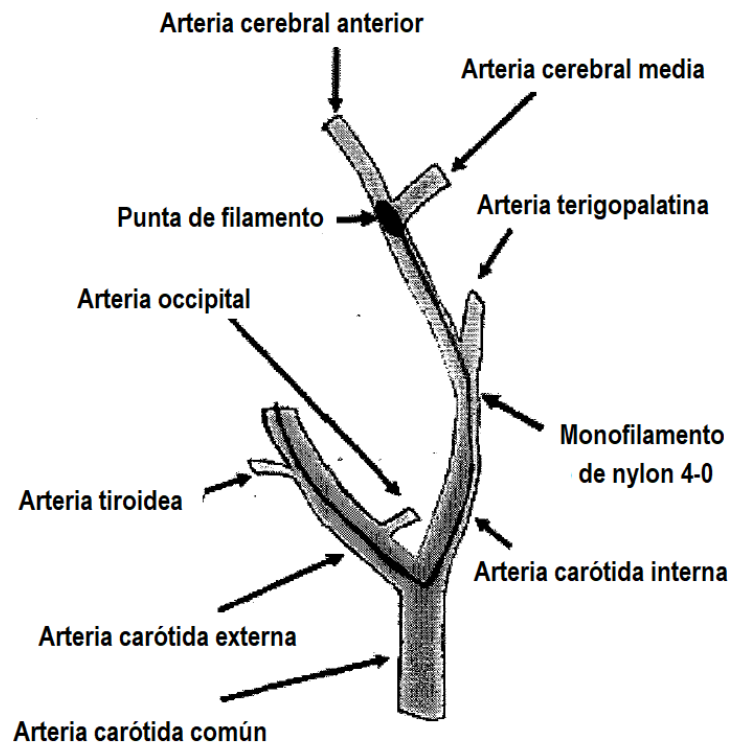
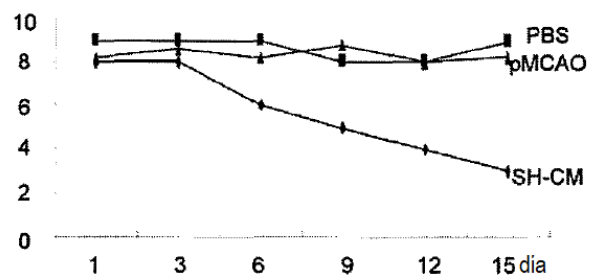


FIG.27



PBS: solución salina tamponada con fosfato, pMCAO: isquemia cerebral focal permanente
SH-CM: medio acondicionado derivado de SHED

FIG.28

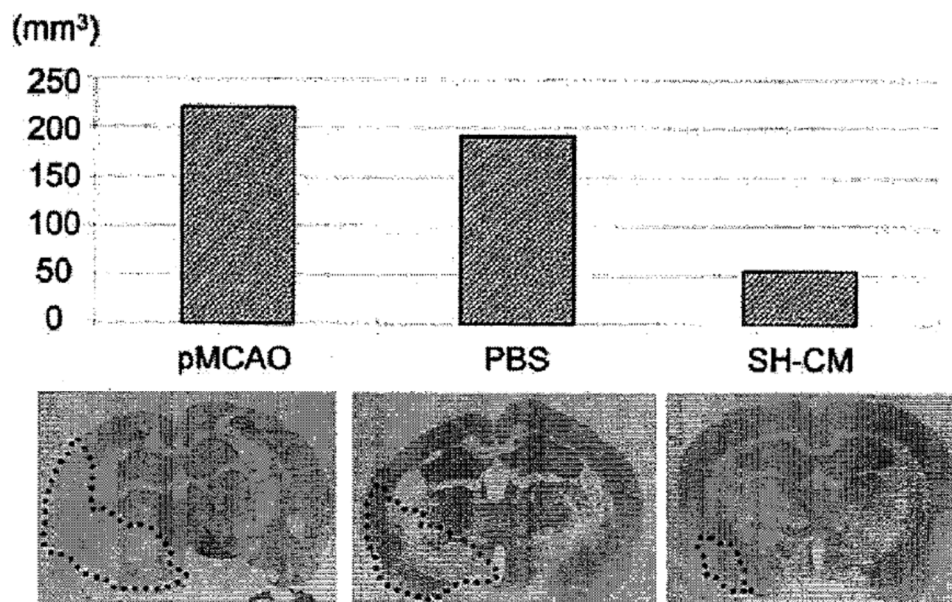


FIG.29

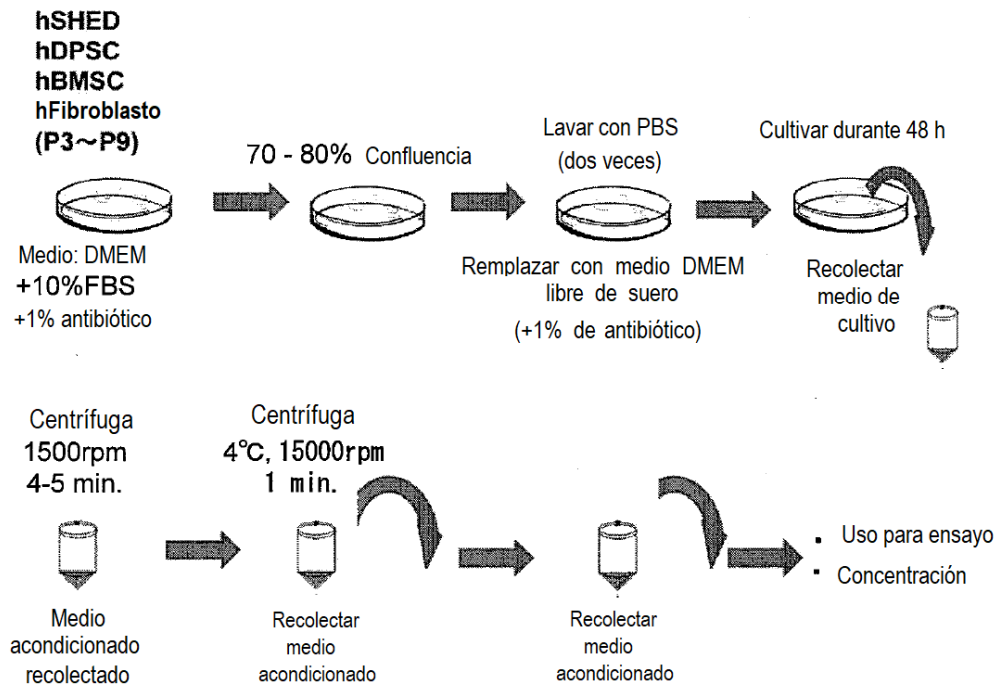


FIG.30

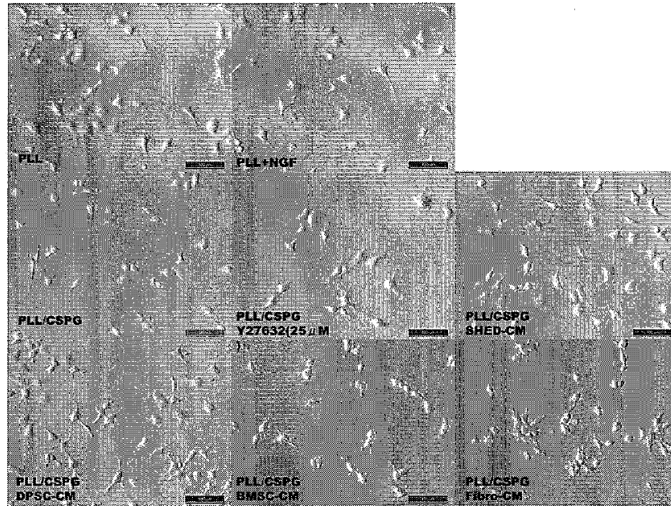


FIG.31

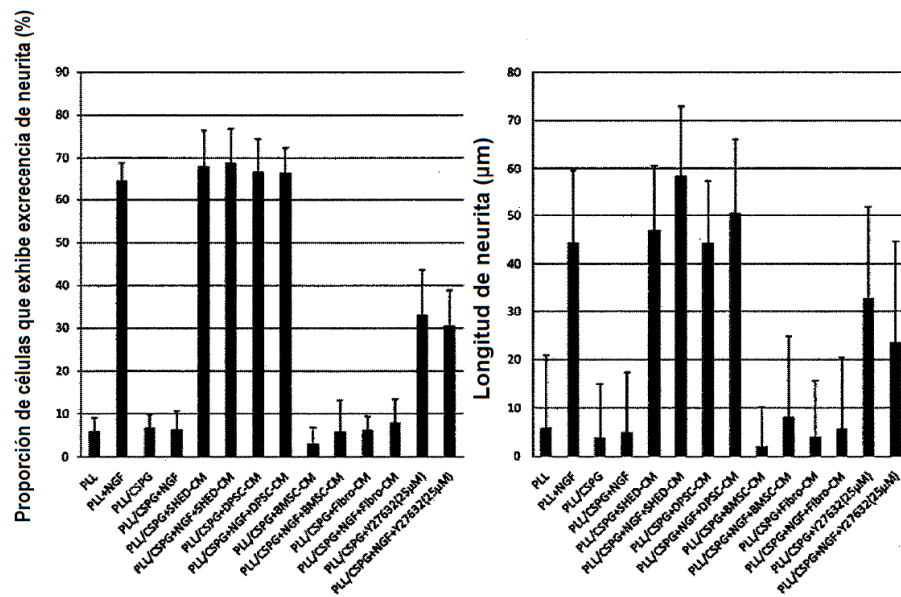


FIG.32

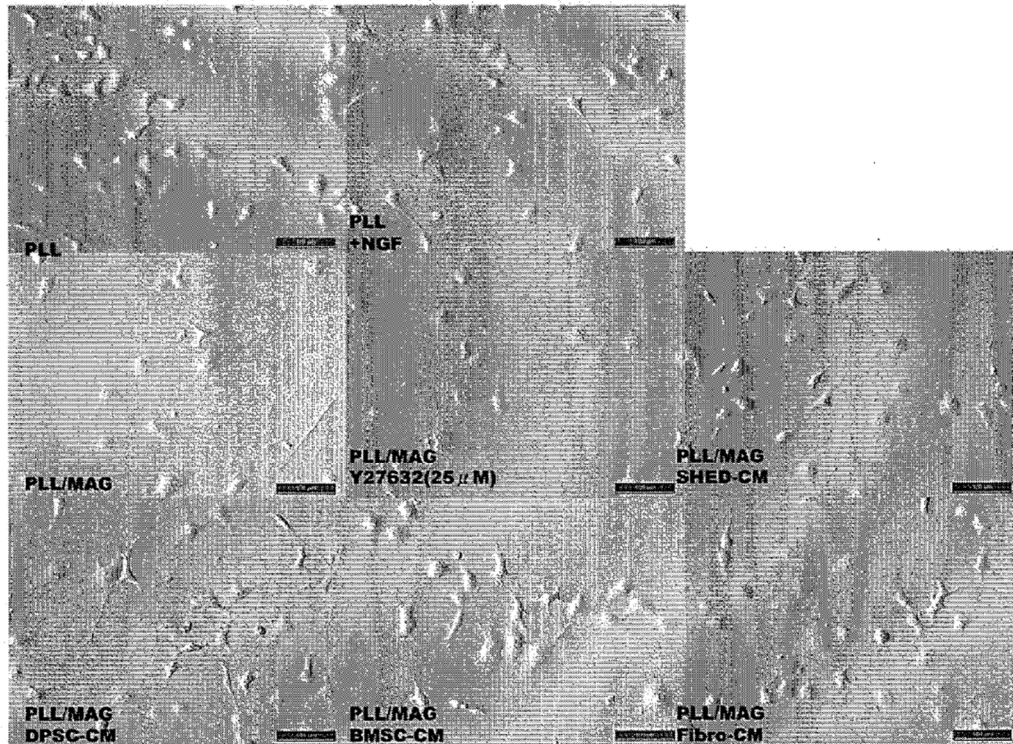


FIG.33

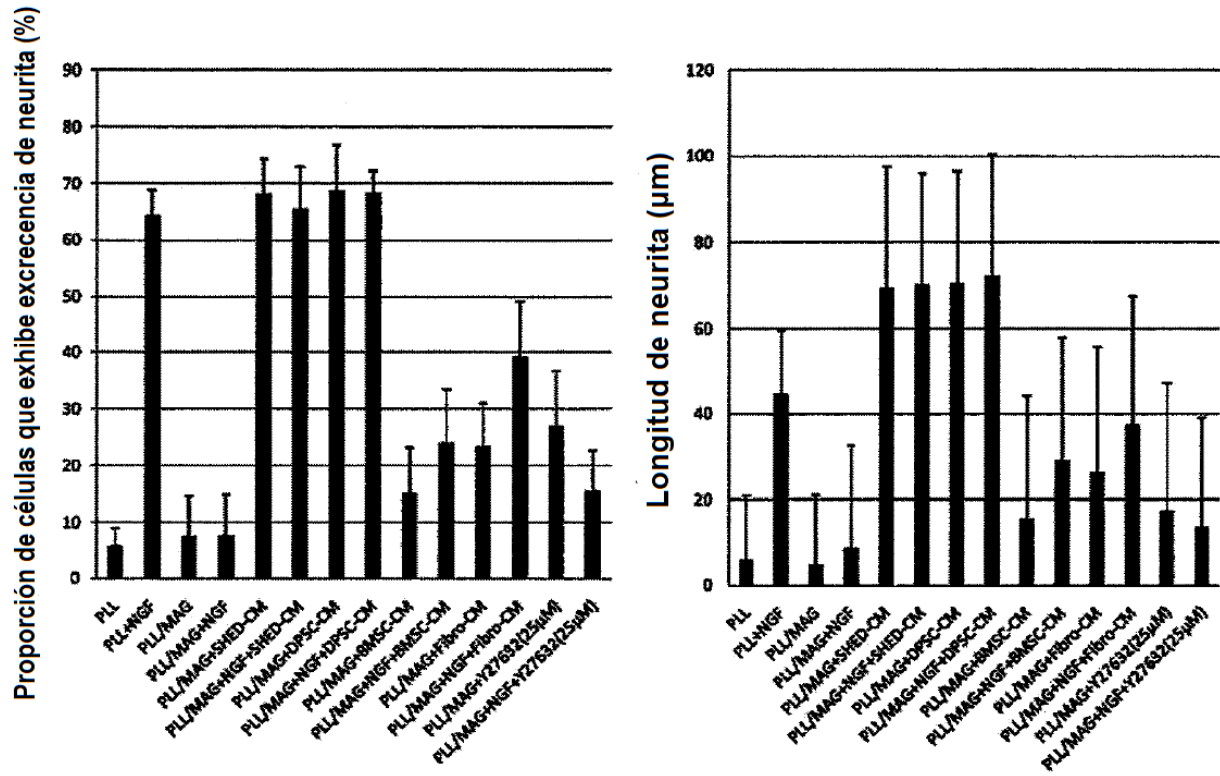


FIG.34

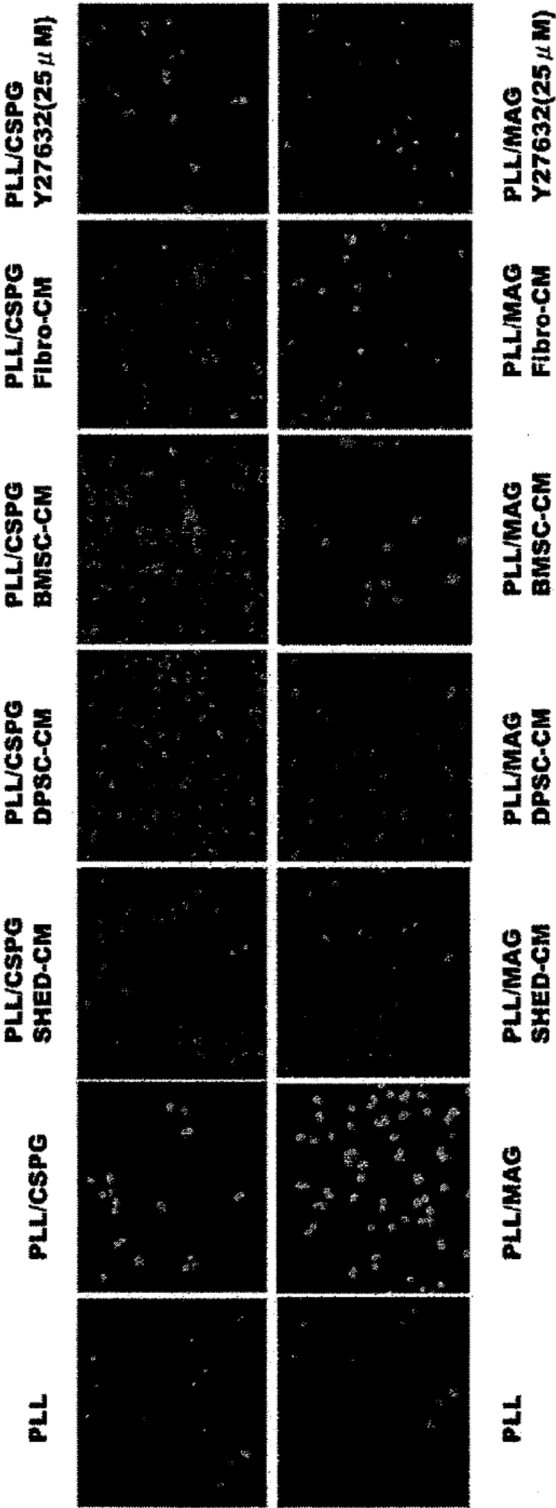


FIG.35

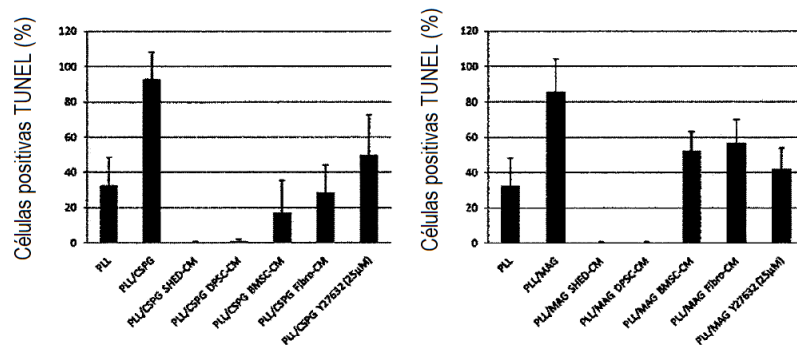


FIG.36

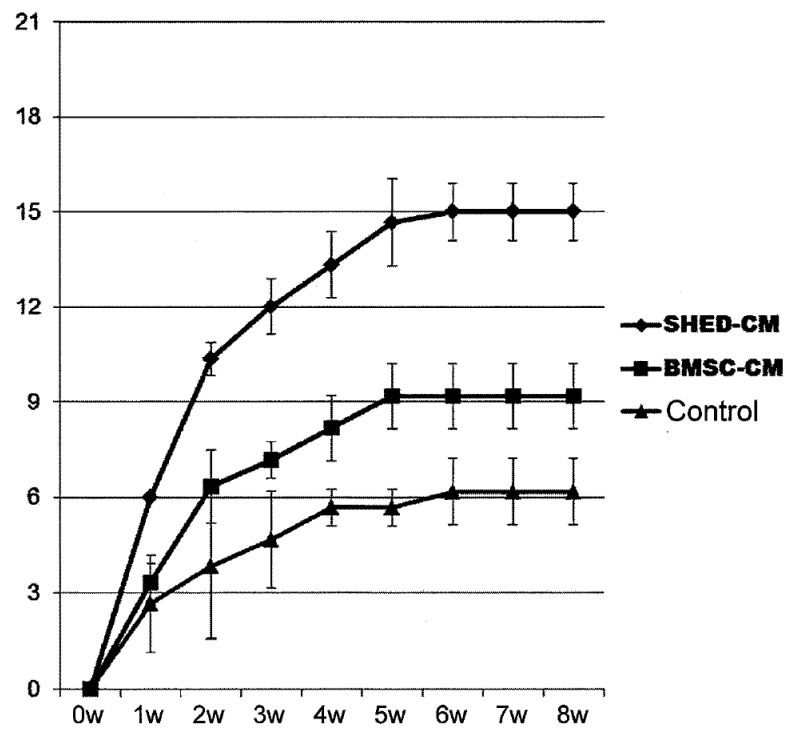


FIG.37

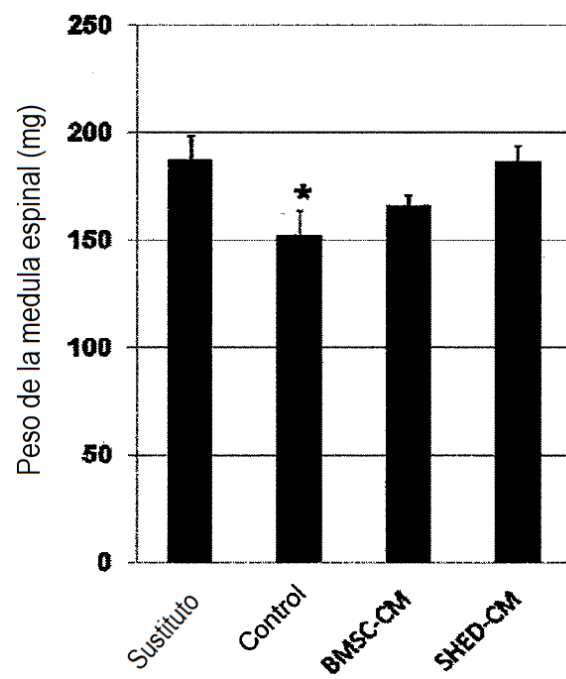
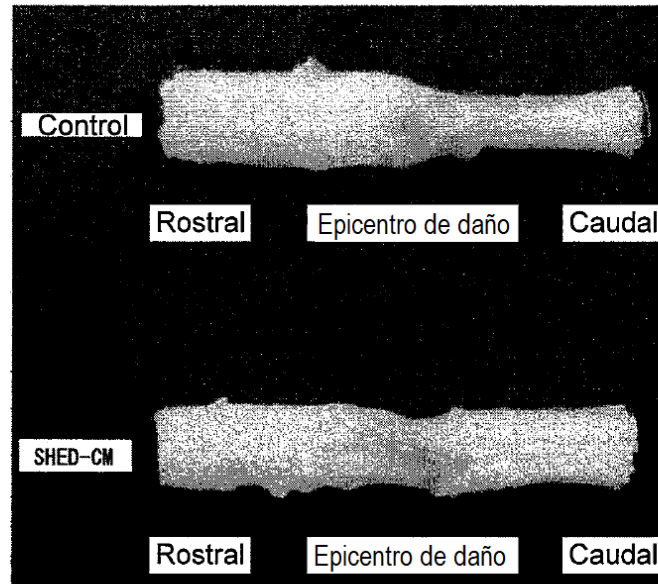


FIG.38

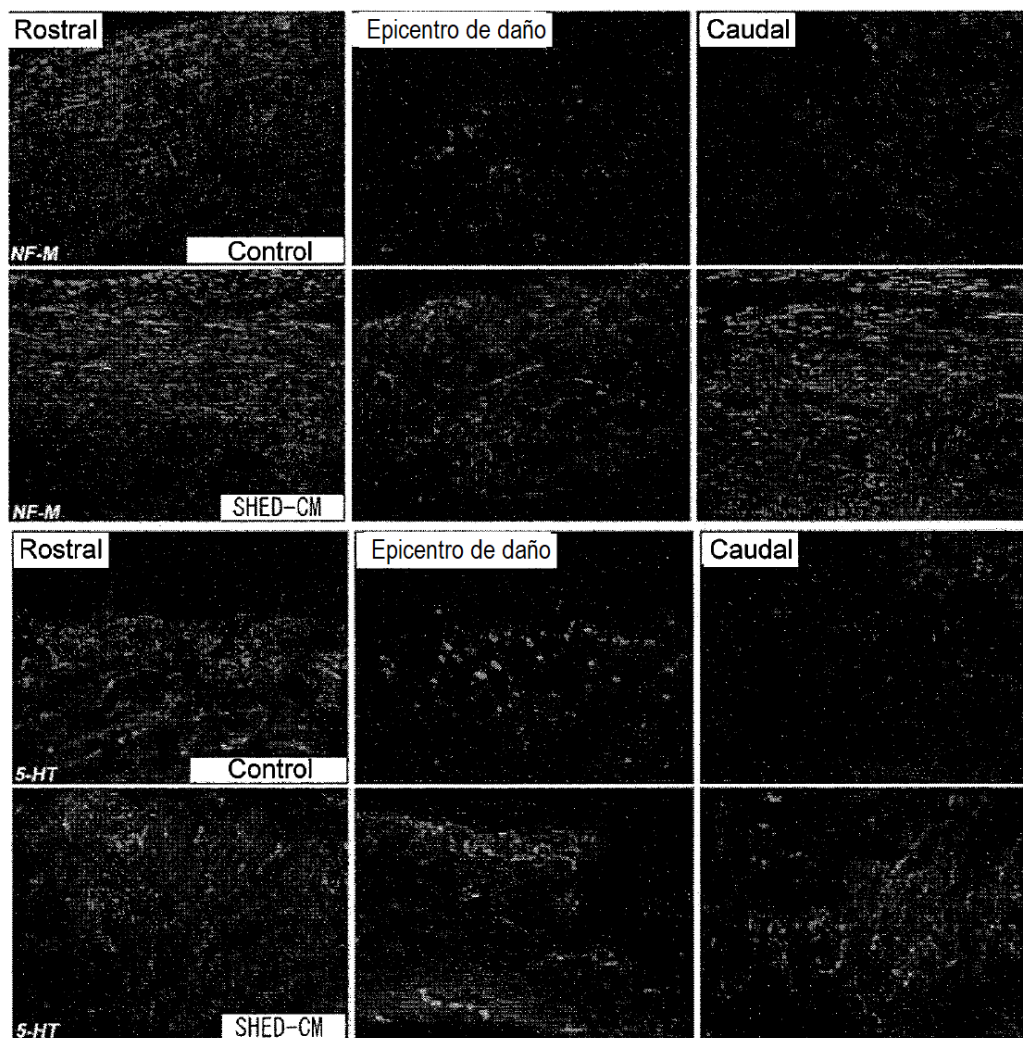


FIG.39

