

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 265**

51 Int. Cl.:

C12P 21/04 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2010 PCT/US2010/041583**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11006107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2010 E 10797941 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2451964**

54 Título: **Medio condicionado y composiciones de matriz extracelular de células cultivadas en condiciones hipóxicas**

30 Prioridad:

25.08.2009 US 547422

07.12.2009 US 632721

10.07.2009 US 501312

24.07.2009 US 509171

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.05.2018

73 Titular/es:

**HISTOGEN, INC. (100.0%)
10655 Sorrento Valley Road
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**NAUGHTON, GAIL K.;
ZEIGLER, FRANK;
BAUMGARTNER, MARK y
NICKEY, KYLE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 667 265 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

Medio condicionado y composiciones de matriz extracelular de células cultivadas en condiciones hipóxicas

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general a la producción y el uso de composiciones de matriz extracelular o medio condicionado y más específicamente a composiciones y/o proteínas obtenidas cultivando células en condiciones hipóxicas en un medio de crecimiento adecuado y usos de las mismas.

Antecedentes

15 La matriz extracelular (MEC) es una entidad compleja que rodea y que soporta a las células que están presentes *in vivo* dentro de tejidos de mamífero. La MEC se denomina con frecuencia tejido conjuntivo. La MEC está compuesta principalmente por tres clases principales de biomoléculas incluyendo proteínas estructurales tales como colágenos y elastinas, proteínas especializadas tales como fibrilinas, fibronectinas y lamininas, y proteoglicanos.

20 El crecimiento de composiciones de MEC *in vitro* y su uso en una variedad de aplicaciones terapéuticas y médicas han sido descrito en la técnica. Otra aplicación terapéutica de tales composiciones de MEC incluye el tratamiento y reparación de defectos en el tejido blando y la piel tales como arrugas y cicatrices.

25 La reparación o el aumento de defectos en el tejido blando provocados por defectos, tales como, acné, cicatrización quirúrgica o envejecimiento han demostrado ser muy difíciles. Se han usado varios materiales para corregir defectos en el tejido blando con grados de éxito variables, sin embargo, ningún material ha sido completamente seguro y efectivo. Por ejemplo, El silicio provoca una variedad de problemas fisiológicos y clínicos incluyendo efectos secundarios a largo plazo, tales como nódulos, celulitis recurrente y úlceras cutáneas.

30 Las composiciones de colágeno se han usado también como un material inyectable para el aumento de tejido blando. El colágeno es la proteína principal del tejido conjuntivo y la proteína más abundante en los mamíferos, constituyendo aproximadamente el 25 % del contenido en proteína total. Actualmente existen 28 tipos de colágeno descritos en la bibliografía (véase, por ejemplo, Tablas 1 y 2 *posteriormente*, para una enumeración detallada). Sin embargo, más del 90 % del colágeno en el organismo son Colágenos I, II, III y IV.

35 Se han usado diferentes materiales de colágeno para el tratamiento de defectos en el tejido blando, tales como colágeno de bovino inyectable reconstituido, colágeno reticulado, u otros colágenos xenogénicos. Sin embargo, existen varios problemas con los colágenos de este tipo. Un problema común incluye la complejidad y el alto coste de producción de los materiales de implante para eliminar sustancias potencialmente inmunogénicas para evitar reacciones alérgicas en el sujeto. Adicionalmente, los tratamientos que usan tales colágenos no han demostrado ser de larga duración.

45 Se han descrito también otros materiales que pueden usarse para la reparación o el aumento de tejido blando, tales como, partículas de cerámica biocompatibles en geles acuosos (patente de los Estados Unidos n.º 5.204.382), materiales termoplásticos y/o termoestables (patente de los Estados Unidos n.º 5.278.202), y combinaciones de polímero a base de ácido láctico (patente de los Estados Unidos n.º 4.235.312). Adicionalmente, se ha descrito también el uso de composiciones de MEC secretadas naturalmente (patente de los Estados Unidos n.º 6.284.284). Sin embargo, todos los materiales de este tipo han mostrado tener limitaciones.

50 Por consiguiente, se necesitan nuevos materiales para la reparación y el aumento de tejido blando que superen las deficiencias de los materiales anteriores.

55 Existe la necesidad de proporcionar un material para la reparación y el aumento de tejido blando, seguro, inyectable, de larga duración, bioabsorbible.

60 Las composiciones de MEC cultivadas *in vitro* pueden usarse adicionalmente para tratar el tejido dañado, tal como, músculo cardíaco dañado y tejido relacionado. Las composiciones son útiles como implantes o recubrimientos biológicos en dispositivos implantables, tales como, endoprótesis vasculares; prótesis vasculares para promover la vascularización en órganos, tales como el corazón y tejido relacionado; y dispositivos útiles en la reparación de hernias, reparación del suelo pélvico, reparación de heridas, y reparación de manguito de los rotadores, tales como parches y similares.

65 La cardiopatía coronaria (CHD), también denominada arteriopatía coronaria (CAD), cardiopatía isquémica y cardiopatía aterosclerótica, se caracteriza por un estrechamiento de los vasos sanguíneos pequeños que suministran sangre y oxígeno al corazón. La cardiopatía coronaria está provocada habitualmente por una afección denominada aterosclerosis, que se produce cuando se acumula material graso y placa sobre las paredes de las

arterias, provocando que las arterias se estrechen. A medida que las arterias coronarias se estrechan, puede ralentizarse o detenerse el flujo sanguíneo al corazón, provocando dolor de pecho (angina estable), dificultad para respirar, infarto cardiaco y otros síntomas.

5 La cardiopatía coronaria (CHD) es la causa principal de muerte en los Estados Unidos para hombres y mujeres. De acuerdo con la American Heart Association, más de 15 millones de personas presentan alguna forma de la afección. Aunque los síntomas y signos de la cardiopatía coronaria son evidentes en el estado avanzado de la enfermedad, la mayoría de los individuos con cardiopatía coronaria no muestran evidencia alguna de enfermedad durante décadas, ya que la enfermedad avanza antes de que se produzca un infarto de miocardio súbito. La enfermedad es la causa más común de muerte súbita, y es también el motivo más común de muerte de hombres y mujeres por encima de los 10 20 años de edad. De acuerdo con las presentes tendencias en los Estados Unidos, la mitad de los hombres sanos de 40 años de edad desarrollarán CHD en el futuro, así como una de cada tres mujeres sanas de 40 años de edad.

15 Los métodos actuales para mejorar el flujo sanguíneo en un corazón enfermo o dañado de otro modo implican técnicas quirúrgicas invasivas, tales como, cirugía de derivación coronaria, angioplastia y endarterectomía. Tales procedimientos implican naturalmente altos grados de riesgo inherente durante y después de la cirugía, y con frecuencia, proporcionan únicamente un remedio temporal para la isquemia cardiaca. Por consiguiente, se requieren nuevas opciones de tratamiento para aumentar el éxito de las técnicas actualmente disponibles para tratar CHD y síntomas relacionados.

20 Las composiciones de MEC cultivadas *in vitro* pueden usarse adicionalmente para reparar y/o regenerar las células o el tejido dañados, tales como células condrales u osteocondrales. El tejido osteocondral es cualquier tejido que se refiera o que contenga hueso o cartílago. Las composiciones de la presente invención son útiles para el tratamiento de defectos osteocondrales, tales como enfermedades degenerativas de tejido conjuntivo, tales como artritis reumatoide y/o osteoartritis así como defectos en pacientes que tienen defectos de cartílago debidos a un traumatismo.

30 Los intentos actuales de reparar los defectos osteocondrales incluyen la implantación de condrocitos humanos en injertos de hidrogel biocompatibles y biodegradables en intentos de mejorar las posibilidades de restaurar las lesiones de cartílago articular. Adicionalmente, la técnica de cultivo de condrocitos en perlas de alginato o una matriz que incluye alginato polisulfatado se ha descrito para generar un tejido cartilaginoso de tipo hialina. Sin embargo, los intentos en la reparación de lesiones encondrales de cartílago articular mediante la implantación de condrocitos autólogos humanos han tenido un éxito limitado. Por consiguiente, se requieren nuevas opciones de tratamiento para aumentar el éxito de las técnicas actualmente disponibles para tratar los defectos osteocondrales.

35 Las composiciones de MEC cultivadas *in vitro* son también útiles en sistema de cultivo tisular para la generación de implantes de tejido por ingeniería genética. El campo de la ingeniería de tejidos implica el uso de tecnología de cultivo celular para generar nuevos tejidos biológicos o reparar tejidos dañados. Impulsada en parte por la revolución de las células madre, la tecnología de ingeniería de tejidos ofrece la promesa de la regeneración y sustitución tisular después de un traumatismo o tratamiento de enfermedades degenerativas. Puede usarse también en el contexto de procedimientos cosméticos.

40 Las técnicas de ingeniería de tejidos pueden usarse para generar tejido o células tanto autólogos como heterólogos usando una variedad de tipos celulares y técnicas de cultivo. En la creación de un implante autólogo, el tejido donador debe recogerse y disociarse en células individuales y, posteriormente, unirse y cultivarse sobre un sustrato que va a implantarse en el sitio deseado del tejido funcional. Muchos tipos celulares aislados pueden expandirse *in vitro* usando técnicas de cultivo celular, sin embargo, las células dependientes de anclaje requieren que entornos específicos, que incluyen con frecuencia la presencia de un armazón tridimensional, actúen como molde para el crecimiento.

50 La tecnología de ingeniería de tejidos actual proporciona, en general, implantes artificiales. Una terapia de trasplante de células satisfactorio depende del desarrollo de sustratos adecuados para cultivos tisulares tanto *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, el desarrollo de un MEC que contiene solamente materiales naturales y que es adecuado para la implantación, tendría más de las características del tejido endógeno. Por consiguiente, la generación de material de MEC natural es un desafío continuo en el campo de la ingeniería de tejidos.

Sumario de la invención

60 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento fundamental de que las células cultivadas (*por ejemplo*, en dos dimensiones o tres dimensiones) en condiciones que estimulan el entorno embrionario temprano (*por ejemplo*, hipoxia y fuerzas gravitacionales reducidas) producen composiciones de MEC con propiedades fetales. Las composiciones de MEC producidas cultivando células en condiciones hipóxicas que contienen una o más proteínas embrionarias tienen una variedad de aplicaciones beneficiosas.

65 La presente invención proporciona composiciones de MEC que comprenden una o más proteínas embrionarias producidas mediante un método que incluye cultivar fibroblastos en condiciones hipóxicas durante al menos 2

semanas (*por ejemplo*, crecimiento bidimensional o tridimensional) en un medio de crecimiento adecuado sobre un soporte, en donde el soporte es una malla o una perla, que contiene FGF básico (bFGF), bajo un 1-5 % de oxígeno, produciendo de ese modo células madre pluripotentes, en donde las células madre producen y secretan al medio y en el cultivo celular o superficies, una fracción soluble y una no soluble. En diversos aspectos, las composiciones incluyen la fracción soluble o no soluble por separado, así como combinaciones de la fracción soluble e insoluble. En diversos aspectos, las composiciones producidas incluyen regulación por incremento de la expresión génica y producción de lamininas, colágenos y factores de Wnt. En otros aspectos, las composiciones producidas incluyen regulación por disminución de la expresión génica de lamininas, colágenos y factores de Wnt. En otros aspectos, las composiciones son específicas de la especie e incluyen células y/o material biológico de una única especie animal. Aunque las composiciones de MEC cultivadas *in vitro* son útiles en el tratamiento de seres humanos, tales composiciones pueden aplicarse a otras especies de animales. Por consiguiente, tales composiciones son adecuadas para aplicaciones veterinarias.

Las composiciones que comprenden una o más proteínas de la invención son para su uso en medicina y/o en métodos cosméticos para estimular o promover el crecimiento del cabello. Las composiciones de MEC o el medio condicionado que se describen en el presente documento entran en contacto con una célula. En un aspecto a modo de ejemplo, la célula es una célula de folículo piloso. En diversos aspectos, la célula puede ponerse en contacto *in vivo* o *ex vivo*.

La presente divulgación proporciona un método de producción de una proteína Wnt y un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El método incluye cultivar células en condiciones hipóxicas (*por ejemplo*, crecimiento bidimensional o tridimensional) en un medio de crecimiento adecuado, produciendo de ese modo la proteína Wnt y el VEGF. El medio de crecimiento está libre de suero y las condiciones hipóxicas de oxígeno son un 1-5 % de oxígeno. Las especies de Wnt se regulan por incremento en comparación con medios producidos en condiciones de oxígeno de aproximadamente un 15-20 % de oxígeno. En un aspecto a modo de ejemplo, las especies de Wnt son wnt 7a y wnt 11. El medio condicionado se aísla como una composición que contiene diversas proteínas tal como se describe en el presente documento.

La presente divulgación incluye un sistema de cultivo tisular. El sistema de cultivo se compone de las composiciones de MEC o medio cultivado que se describen en el presente documento, tal como se incluyen en materiales de soporte bidimensionales o tridimensionales. Las composiciones de MEC que se describen en el presente documento sirven como soporte o soporte bidimensional o tridimensional para el crecimiento de diversos tipos celulares. *Por ejemplo*, el sistema de cultivo puede usarse para soportar el crecimiento de células madre. Las células madre son células madre embrionarias, células madre mesenquimales o células madre neuronales.

La invención incluye la generación de una célula madre cultivando células (*por ejemplo*, fibroblastos, en condiciones hipóxicas) generando de ese modo células que expresan genes característicos de células madre a un nivel al menos 3 veces mayor que cuando crecen en condiciones normóxicas. Tales genes pueden incluir Oct4, Sox2, KLF4, NANOG y cMyc, *por ejemplo*.

Las células madre generadas mediante el método de la invención son preferentemente pluripotentes. Cualquier célula de estroma o célula que sea célula madre puede usarse como tipo de célula de partida.

Las composiciones que comprenden una o más proteínas de la invención son para su uso en medicina y/o en métodos cosméticos para estimular o promover el crecimiento del cabello. Las composiciones de MEC o el medio condicionado que se describen en el presente documento entran en contacto con una célula. En un aspecto a modo de ejemplo, la célula es una célula de folículo piloso. En diversos aspectos la célula puede ponerse en contacto *in vivo* o *ex vivo*.

50 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra representaciones gráficas de la formación de FBGC 2 semanas después de la implantación de malla de polipropileno recubierta con MECh. La Figura 1A muestra el número de FBGC por fibra 2 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas (primera columna) y fibras recubiertas con MECh (segunda columna). La Figura 1B muestra el número de FBGC por fibra 2 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas (columnas 1-3) y fibras recubiertas con MEC (columnas 4-6). * indica $p < 0,05$.

La Figura 2 muestra representaciones gráficas de la formación de FBGC 2 semanas después de la implantación de malla de polipropileno recubierta con MECh. La Figura 2A muestra el número de FBGC por fibra 5 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas (primera columna) y fibras recubiertas con MECh (segunda columna). La Figura 2B muestra el número de FBGC por fibra 5 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas (columnas 1 y 3) y fibras recubiertas con MECh (columnas 2 y 4).

La Figura 3 muestra representaciones ilustrativas de células de folículo piloso humano. La Figura 3A es una imagen de células de folículo piloso humano después del cultivo celular durante cuatro semanas en presencia de

MECh y posterior trasplante en un ratón y crecimiento durante 4 semanas adicionales, mientras que la Figura 3B es una imagen de células de folículo de control.

5 La Figura 4 muestra una representación gráfica de respuesta metabólica fibroblástica a composiciones de matriz extracelular (tanto MEC de ratón y MEC de ser humano) tal como se muestra mediante ensayo de MTT.

La Figura 5 es una representación gráfica del número de células en respuesta a la exposición a fibroblastos humanos a MECh tal como se mide mediante ensayo Pico Green.

10 La Figura 6 es una representación gráfica de las evaluaciones de eritema para 41 sujetos humanos tomadas en los días 3, 7 y 14 después del tratamiento con láser. La gravedad del eritema se evaluó en una escala de 0 (ninguno) a 4 (grave). Cada grupo de 4 conjuntos de datos (10,1X MECh, 1X MECh, 10X MECh, y control de izquierda a derecha) representa evaluaciones en el día 3 (izquierda), 7 (centro) y 14 (derecha).

15 La Figura 7 es una representación gráfica de evaluaciones de edema para 41 sujetos humanos tomadas en los días 3, 7 y 14 después del tratamiento con láser. La gravedad del eritema se evaluó en una escala de 0 (ninguno) a 2,5 (grave). Cada grupo de 4 conjuntos de datos (10,1X MECh, 1X MECh, 10X MECh, y control de izquierda a derecha) representa evaluaciones en el día 3 (izquierda), 7 (centro) y 14 (derecha).

20 La Figura 8 es una representación gráfica de evaluaciones de costra para 41 sujetos humanos tomadas en los días 3, 7 y 14 después del tratamiento con láser. La gravedad del eritema se evaluó en una escala de 0 (ninguno) a 3,5 (grave). Cada grupo de 4 conjuntos de datos (0,1X MECh, 1X MECh, 10X MECh, y control de izquierda a derecha) representa evaluaciones en el día 3 (izquierda), 7 (centro) y 14 (derecha).

25 La Figura 9 es una representación gráfica de valores de pérdida de agua transepidérmica (TWEL) para 41 sujetos humanos tomadas en los días 3, 7 y 14 después del tratamiento con láser. La gravedad de TWEL se evaluó en una escala de 0 (ninguna) a 4 (grave). Cada grupo de 4 conjuntos de datos (10,1X MECh, 1X MECh, 10X MECh, y control de izquierda a derecha) representa evaluaciones en el día 3 (izquierda), 7 (centro) y 14 (derecha).

30 La Figura 10 es una representación gráfica de análisis de imágenes de perfilometría tridimensional de réplicas de silicio del área periocular. Los puntos de datos se tomaron para 22 sujetos antes del tratamiento con láser, 4 semanas después del tratamiento y 10 semanas después del tratamiento. La serie de datos A representa valores para la administración de MECh; la serie de datos B representa el control.

35 La Figura 11 es una representación gráfica del análisis del uso de petrolato después de cirugía con láser.

La Figura 12 es una representación gráfica del análisis de eritema cutáneo con puntos de datos tomados en los días 0, 3, 5, 7, 10 y 14 después de cirugía con láser.

40 La Figura 13 es una representación gráfica de análisis con mexámetro con puntos de datos tomados en los días 0, 3, 5, 7, 10 y 14 después de cirugía con láser.

45 La Figura 14 muestra representaciones gráficas de la formación de FBGC 2 semanas después de la implantación de malla de polipropileno recubierta con MECh. La Figura 14A muestra el número de FBGC por fibra 2 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas (primera columna) y fibras recubiertas con MECh (segunda columna). La Figura 14B muestra el número de FBGC por fibra 2 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas y fibras recubiertas con MEC.

50 La Figura 15 muestra representaciones gráficas de la formación de FBGC 5 semanas después de la implantación de malla de polipropileno recubierta con MECh. La Figura 15A muestra el número de FBGC por fibra 5 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas (primera columna) y fibras recubiertas con MECh (segunda columna). La Figura 15B muestra el número de FBGC por fibra 5 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas y fibras recubiertas con MEC.

55 La Figura 16 muestra representaciones gráficas de los espesores de cápsula fibrosa medios determinados 2 semanas después de la implantación de malla de polipropileno recubierta con MECh. La Figura 16A muestra los espesores de cápsula fibrosa medios 2 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas (primera columna) y fibras recubiertas con MECh (segunda columna). La Figura 16B muestra los espesores de cápsula fibrosa medios 2 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas y fibras recubiertas con MEC.

60 La Figura 17 muestra representaciones gráficas de los espesores de cápsula fibrosa medios determinados 5 semanas después de la implantación de malla de polipropileno recubierta con MECh. La Figura 17A muestra los espesores de cápsula fibrosa medios 5 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas (primera columna) y fibras recubiertas con MECh (segunda columna). La Figura 17B muestra los espesores de cápsula fibrosa medios 5 semanas después de la implantación para fibras no recubiertas y fibras recubiertas con MEC.

65

La Figura 18 muestra una representación gráfica de un histograma que muestra las características del crecimiento del cabello después de la administración de MECh incluyendo wnt 7a.

5 La Figura 19 muestra una representación tabular que muestra las características del crecimiento del cabello para 2 sujetos de prueba a las 12 semanas tras el comienzo de un estudio que somete a prueba la eficacia de la administración de MECh incluyendo wnt 7a.

10 La Figura 20 muestra una representación tabular que muestra las características del crecimiento del cabello para 2 sujetos de prueba a las 22 semanas tras el comienzo de un estudio que somete a prueba la eficacia de la administración de MECh incluyendo wnt 7a.

15 La Figura 21 muestra representaciones gráficas de los resultados agregados de sujetos control en comparación con sujetos tratados, no incluyendo ninguna perturbación. La Figura 21A muestra los resultados a los 3 meses. La Figura 21B muestra los resultados a los 5 meses.

La Figura 22 muestra representaciones gráficas de los resultados agregados de sujetos control en comparación con sujetos tratados con MECh, no incluyendo ninguna perturbación. La Figura 22 A muestra los resultados a los 3 meses. La Figura 22B muestra los resultados a los 5 meses.

20 La Figura 23 muestra una representación gráfica de la distribución de las respuestas de los sujetos medidas por la densidad capilar terminal respecto a un tratamiento con MECh a los 3 meses.

La Figura 24 muestra una representación gráfica de la distribución de las respuestas de los sujetos medidas por la densidad de pelo veloso respecto a un tratamiento con MECh a los 3 meses.

25 La Figura 25 muestra una representación gráfica de la distribución de las respuestas de los sujetos medidas por la densidad capilar en espesor respecto a un tratamiento con MECh a los 3 meses.

30 La Figura 26 muestra una representación gráfica de la distribución de las respuestas de los sujetos medidas por la media de cabello en espesor respecto a un tratamiento con MECh a los 3 meses.

La Figura 27 muestra una representación gráfica de medición del crecimiento del cabello.

35 La Figura 28 muestra una representación gráfica de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se refiere a composiciones de MEC o medio condicionado que incluyen una o más proteínas embrionarias producidas mediante los métodos tal como se describen en el presente documento para su uso en medicina y/o métodos cosméticos para estimular o promover el crecimiento del cabello. En particular, las composiciones se generan cultivando fibroblastos en condiciones hipóxicas durante al menos 2 semanas (*por ejemplo*, crecimiento bidimensional o tridimensional) en un medio de crecimiento adecuado sobre un soporte en donde el soporte es malla o perlas, bajo un 1-5 % de oxígeno, produciendo de ese modo células madre pluripotentes, en donde las células madre producen y secretan al medio y en el cultivo celular o superficies. El método de cultivo produce tanto fracciones solubles como fracciones no solubles que pueden usarse por separado o en combinación para obtener composiciones fisiológicamente aceptables que tienen una variedad de aplicaciones.

50 La división, diferenciación y función de las células madre y progenitores multipotentes se ven afectadas por señales complejas en el microentorno, incluyendo la disponibilidad de oxígeno. Regiones de grave falta de oxígeno (hipoxia) surgen en los tumores, por ejemplo, debido a la rápida división celular y a la formación aberrante de vasos sanguíneos. Los factores inducibles por hipoxia (HIF) median respuestas transcripcionales para localizar hipoxia en tejidos normales y en cánceres y pueden promover la progresión tumoral alterando el metabolismo celular y estimulando la angiogénesis. Recientemente, se ha mostrado que los HIF activan rutas de señalización específicas tales como Notch y la expresión de factores de transcripción tales como Oct4 que controlan la autorrenovación de células madre y la multipotencia. Debido a que se cree que muchos cánceres se desarrollan a partir de un pequeño número de "células madre cancerosas" transformadas, que se autorrenuevan, y multipotentes, estos resultados sugieren nuevos papeles para los HIF en la progresión tumoral. Los datos mostrados en los presentes ejemplos indican que las células cultivadas en condiciones hipóxicas expresan genes normalmente asociados con células pluripotentes, tales como Oct4, NANOG, Sox2, KLF4 y cMyc, por ejemplo.

Las composiciones de la presente invención tienen una variedad de aplicaciones, por ejemplo crecimiento del cabello para su uso tanto en medicina como en métodos cosméticos.

65 La invención se basa en parte, en el descubrimiento de que las células cultivadas sobre perlas (microportadores) o armazones tridimensionales en condiciones que estimulan el entorno embrionario temprano (hipoxia y fuerzas

gravitacionales reducidas) antes de la angiogénesis producen composiciones de MEC con propiedades fetales, incluyendo generación de proteínas embrionarias. El crecimiento de fibroblastos en condiciones hipóxicas demuestra un MEC único y medio condicionado con propiedades fetales y expresión de factor de crecimiento. A diferencia del cultivo de MEC en condiciones de cultivo tradicionales, más de 5000 genes se expresan diferencialmente en MEC cultivada en condiciones hipóxicas. Esto da como resultado una MEC cultivada que tiene diferentes propiedades y una composición biológica diferente. Por ejemplo, una MEC producida en condiciones hipóxicas es similar al tejido mesenquimal fetal por que es relativamente rica en colágenos de tipo III, IV, y V, y glicoproteínas tales como fibronectina, SPARC, trombospondina, y ácido hialurónico.

La hipoxia potencia también la expresión de factores que regulan la cicatrización de heridas y la organogénesis, tales como VEGF, FGF-7, y TGF- β , así como múltiples factores de Wnt incluyendo wnts 2b, 4, 7a, 10a, y 11. MEC embrionaria cultivada de ser humano estimula también un aumento de actividad metabólica en fibroblastos humanos *in vitro*, tal como se mide por una actividad enzimática aumentada. Adicionalmente, existe un aumento en el número de células en respuesta a la MEC embrionaria cultivada.

Tal como se usan en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", y "el", "la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a "el método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo que se describe en el presente documento que serán evidentes para los expertos en la materia después de leer esta divulgación y así sucesivamente.

La presente invención implica métodos para preparar composiciones de MEC que incluyen una o más proteínas embrionarias y aplicaciones de las mismas. En particular, las composiciones se generan cultivando fibroblastos en condiciones hipóxicas durante al menos 2 semanas en un medio de crecimiento adecuado en donde el soporte es malla o perlas, bajo un 1-5 % de oxígeno, produciendo de ese modo células madre pluripotentes, en donde las células madre producen y secretan al medio y en el cultivo celular o superficies. El crecimiento como monocapas o sobre perlas/microportadores se contempla en la presente invención. Además, las composiciones puede derivarse haciendo crecer células sobre un marco tridimensional, dando como resultado un sistema de cultivo celular multicapa. Las células que se han hecho crecer en un soporte de marco tridimensional, de acuerdo con la presente invención, crecen en múltiples capas, formando una matriz celular. El crecimiento de las células cultivadas en condiciones hipóxicas da como resultado una expresión génica diferencial como resultado de condiciones de cultivo hipóxicas frente al cultivo tradicional en la MEC y el medio condicionado.

MEC es una composición de proteínas y biopolímeros que comprende sustancialmente tejido que se produce mediante el cultivo de células. Las células del estroma, tales como los fibroblastos, son un tipo de células dependientes de anclaje que requieren crecimiento mientras están unidas a materiales y superficies adecuadas para el cultivo celular. Los materiales de MEC producidos por las células cultivadas se depositan en una disposición tridimensional que proporciona espacios para la formación de estructuras similares a los tejidos.

Los materiales de cultivo que proporcionan arquitecturas tridimensionales se denominan armazones. Los espacios para el depósito de MEC están en forma de aberturas dentro de, por ejemplo, malla tejida, o espacios intersticiales creados en una configuración compactada de perlas esféricas, denominadas microportadores, cuando se desee.

Tal como se usa en el presente documento, "composición de matriz extracelular" incluye tanto fracciones solubles como no solubles o cualquier porción de las mismas. La fracción no soluble incluye aquellas proteínas de MEC secretadas y componentes biológicos que se depositan sobre el soporte o armazón. La fracción soluble se refiere a medios de cultivo o medios condicionales en los que se han cultivado células y en los que las células han secretado agente(s) activo(s) e incluyen aquellas proteínas y componentes biológicos no depositados sobre el armazón. Ambas fracciones pueden recogerse, y opcionalmente procesarse adicionalmente, y usarse individualmente o en combinación en una variedad de aplicaciones tal como se describe en el presente documento.

El soporte o armazón tridimensional usado para cultivar células del estroma puede ser de cualquier material y/o forma que permita a las células unirse al mismo (o pueda modificarse para permitir a las células unirse al mismo); y permita a las células crecer en más de una capa (*es decir*, formar un tejido tridimensional similar al crecimiento de tejido *in vivo*). En otras realizaciones, puede usarse una lámina o membrana sustancialmente bidimensional para cultivar células que tienen una forma suficientemente tridimensional.

El material biocompatible está formado en una estructura o armazón tridimensional, donde la estructura tiene espacios intersticiales para la unión y el crecimiento de células en un tejido tridimensional. Las aberturas y/o espacios intersticiales del marco en algunas realizaciones tienen un tamaño apropiado para permitir a las células estirarse a través de las aberturas o espacios. Mantener células en crecimiento activo estiradas a través del marco parece potenciar la producción del repertorio de factores de crecimiento responsables de las actividades que se describen en el presente documento. Si las aberturas son demasiado pequeñas, las células pueden alcanzar rápidamente la confluencia, pero ser incapaces de salir fácilmente de la malla. Estas células atrapadas pueden mostrar inhibición de contacto y suspender la producción de los factores apropiados necesarios para sustentar la proliferación y mantener cultivos a largo plazo. Si las aberturas son demasiado grandes, las células pueden ser

incapaces de estirarse a través de la abertura, lo que puede conducir a una disminución en la producción de células del estroma de los factores apropiados necesarios para sustentar la proliferación y mantener cultivos a largo plazo. Típicamente, los espacios intersticiales son de al menos aproximadamente 100 μm , al menos 140 μm , al menos aproximadamente 150 μm , al menos aproximadamente 180 μm , al menos aproximadamente 200 μm , o al menos aproximadamente 220 μm . Cuando se usa una tipo de malla de matriz, tal como se muestra a modo de ejemplo en el presente documento, se ha encontrado que las aberturas que oscilan de aproximadamente 100 μm a aproximadamente 220 μm funcionarán satisfactoriamente. Sin embargo, dependiendo de la estructura tridimensional y la complejidad del marco, son aceptables otros tamaños. Cualquier forma o estructura que permita que las células se estiren y sigan replicándose y creciendo durante periodos de tiempo prolongados, puede funcionar para elaborar los factores celulares de acuerdo con los métodos en el presente documento.

En algunos aspectos, el marco tridimensional se forma a partir de polímeros o hilos que se trenzan, tejen, tricotado o dispuesto de otro modo para formar un marco, tal como una malla o material textil. Los materiales pueden formarse también colando el material o mediante fabricación para dar una espuma, matriz, o armazón de tipo esponja. En otros aspectos, el marco tridimensional está en forma de fibras enmarañadas preparadas prensando polímeros u otras fibras juntos para generar un material con espacios intersticiales. El marco tridimensional puede adoptar cualquier forma o geometría para el crecimiento de células en cultivo. Por lo tanto, otras formas del marco, tal como se describe adicionalmente a continuación, pueden ser suficientes para generar el medio condicionado apropiado.

Varios materiales diferentes pueden usarse para formar el armazón o marco. Estos materiales incluyen materiales no poliméricos y poliméricos. Polímeros, cuando se usa, puede ser cualquier tipo de polímero, tal como homopolímeros, polímeros al azar, copolímeros, polímeros de bloque, copolímeros de bloques (*por ejemplo*, di, tri, etc.), polímeros lineales o ramificados, y polímeros reticulados o no reticulados. Ejemplos no limitantes de materiales para su uso como armazones o marcos incluyen, entre otros, fibras de vidrio, polietilenos, polipropilenos, poliamidas (*por ejemplo*, nailon), poliésteres (*por ejemplo*, dacron), poliestirenos, poliacrilatos, compuestos de polivinilo (*por ejemplo*, poli(cloruro de vinilo); PVC), policarbonatos, politetrafluoretlenos (PTFE; TEFLON), thermanox (TPX), nitrocelulosa, polisacáridos (*por ejemplo*, celulosas, quitosano, agarosa), polipéptidos (*por ejemplo*, seda, gelatina, colágeno), poli(ácido glicólico) (PGA), y dextrano.

En algunos aspectos, el marco o microportadores/perlas pueden hacerse de materiales que se degradan con el tiempo en las condiciones de uso. Biodegradable se refiere también a la capacidad de absorción o la degradación de un compuesto o composición cuando se administra *in vivo* o en condiciones *in vitro*. La biodegradación puede producirse a través de la acción de agentes biológicos, ya sea directa o indirectamente. Los ejemplos no limitantes de materiales biodegradables incluyen, entre otros, polilactida, poliglicólido, poli(carbonato de trimetileno), poli(lactida-co-glicólido) (es decir, PGA), poli(tereftalato de etileno) (PET), policaprolactona, material de sutura de catgut, colágeno (*por ejemplo*, espuma de colágeno equino), poli(ácido láctico) o ácido hialurónico. *Por ejemplo*, estos materiales pueden tejerse dando un marco tridimensional tal como una esponja de colágeno o gel de colágeno.

En otros aspectos, donde los cultivos han de mantenerse durante largos periodos de tiempo, crioconservarse, y/o donde se desea una integridad estructural adicional, el marco tridimensional puede estar compuesto por un material no biodegradable. Tal como se usa en el presente documento, un material no biodegradable se refiere a un material que no se degrada o descompone significativamente en las condiciones en el medio de cultivo. Los materiales no degradables a modo de ejemplo incluyen, a modo de ejemplos no limitantes, nailon, dacron, poliestireno, poliacrilatos, polivinilos, politetrafluoroetilenos (PTFE), PTFE expandido (ePTFE), y celulosa. Un marco tridimensional no degradante, a modo de ejemplo, comprende una malla de nailon, disponible con el nombre comercial Nitex®, una malla de filtración de nailon que tiene un tamaño de poro promedio de 140 μm y un diámetro de fibra de nailon promedio de 90 μm (n.º 3-210/36, Tetko, Inc., N.Y.).

En otros aspectos, las perlas, armazón o marco es una combinación de materiales biodegradables y no biodegradables. El material no biodegradable proporciona estabilidad al armazón tridimensional durante el cultivo, mientras que el material biodegradable permite la formación de espacios intersticiales suficientes para generar redes celulares que producen los factores celulares suficientes para aplicaciones terapéuticas. El material biodegradable puede aplicarse como recubrimiento sobre el material no biodegradable o tejerse, trenzarse o formarse dando una malla. Pueden usarse diversas combinaciones de materiales biodegradables y no biodegradables. Una combinación a modo de ejemplo es materiales textiles de poli(tereftalato de etileno) (PET) recubiertos con una película polimérica biodegradable delgada, poli(ácido D-L-láctico-co-glicólico), con el fin de obtener una estructura polar.

En diversos aspectos, el material de armazón o marco puede tratarse previamente antes de la inoculación con células para potenciar la unión celular. *Por ejemplo*, antes de la inoculación con células, tamices de nailon en algunas realizaciones se tratan con ácido acético 0,1 M, y se incuban en polilisina, suero bovino fetal y/o colágeno para recubrir el nailon. El poliestireno podría tratarse de manera similar usando ácido sulfúrico. En otras realizaciones, el crecimiento de células en presencia del marco de soporte tridimensional, puede potenciarse adicionalmente añadiendo al marco o recubriéndolo con proteínas (*por ejemplo*, colágenos, fibras de elastina, fibras reticulares), glucoproteínas, glicosaminoglicanos (*por ejemplo*, heparán sulfato, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato, etc.), fibronectinas, y/o glicopolímero (poli[N-p-vinilbencil-D-lactoamida],

PVLA) con el fin de mejorar la unión celular. El tratamiento del armazón o marco es útil cuando el material es un sustrato malo para la unión de células.

5 En un aspecto, se usa malla para la producción de MEC. La malla es un material de nailon 6 tejido en una forma de ligamento tafetán con aberturas de aproximadamente 100 μm y un espesor de aproximadamente 125 μm . En cultivo, los fibroblastos se unen al nailon a través de interacciones de proteínas cargadas y crecen hacia el interior de los huecos de la malla mientras se producen y depositan proteínas de MEC. Las aberturas de malla que son excesivamente grandes o pequeñas pueden no ser efectivas pero podrían diferenciarse de aquellas anteriores sin alterar sustancialmente la capacidad de producir o depositar MEC. En otro aspecto, se usan otros materiales tejidos para la producción de MEC, tales como poliolefinas, en configuraciones de ligamento que proporcionan una geometría adecuada para el crecimiento celular y el depósito de MEC.

10 Por ejemplo, la malla de nailon se prepara para el cultivo en muchas de las etapas de la invención cortando hasta el tamaño deseado, lavando con ácido acético 0,1-0,5 M seguido de enjuague con agua de alta pureza y luego esterilizando al vapor. Para su uso como armazón tridimensional para la producción de MEC, la malla se dimensiona en forma de cuadrados de aproximadamente 10 cm x 10 cm. Sin embargo, la malla podría ser de cualquier tamaño apropiado para la aplicación prevista y puede usarse en cualquiera de los métodos de la presente invención, incluyendo métodos de cultivo para inoculación, crecimiento celular y producción de MEC y preparación de la forma final.

15 En otros aspectos, el armazón para generar los tejidos cultivados se compone de microportadores, que son perlas o partículas. Las perlas pueden ser microscópicas o macroscópicas y pueden dimensionarse además de modo que permitan la penetración en tejidos o compactarse para formar una geometría particular. Un complejo de las partículas y células es de tamaño suficiente para administrarse en tejidos u órganos, tal como mediante inyección o catéter. Las perlas o microportadores se consideran típicamente un sistema o armazón bidimensional y típicamente permiten el crecimiento bidimensional (por ejemplo, en monocapa).

20 Tal como se usa en el presente documento, un "microportador" se refiere a una partícula que tiene un tamaño de nanómetros a micrómetros, donde las partículas pueden tener cualquier forma o geometría, ya sea irregular, no esférica, esférica o elipsoide.

25 El tamaño de los microportadores adecuados para los fines en el presente documento puede ser cualquier tamaño adecuado para la aplicación particular. En algunas realizaciones, el tamaño de los microportadores adecuados para la invención puede ser aquel administrable por inyección. En algunas realizaciones, los microportadores tienen un intervalo de tamaño de partícula de al menos aproximadamente 1 μm , al menos aproximadamente 10 μm , al menos aproximadamente 25 μm , al menos aproximadamente 50 μm , al menos aproximadamente 100 μm , al menos aproximadamente 200 μm , al menos aproximadamente 300 μm , al menos aproximadamente 400 μm , al menos aproximadamente 500 μm , al menos aproximadamente 600 μm , al menos aproximadamente 700 μm , al menos aproximadamente 800 μm , al menos aproximadamente 900 μm , al menos aproximadamente 1000 μm .

35 En algunos aspectos en los que los microportadores están hechos de materiales biodegradables. En algunos aspectos, pueden usarse microportadores que comprenden dos o más capas de diferentes polímeros biodegradables. En algunas realizaciones, al menos una primera capa exterior tiene propiedades biodegradables para formar los tejidos en cultivo, mientras que al menos una segunda capa interior biodegradable, con propiedades diferentes de las de la primera capa, se prepara para erosionar cuando se administra en un tejido u órgano.

40 En algunos aspectos, los microportadores son microportadores porosos. Se denominan microportadores porosos microportadores que tienen intersticios a través de los que pueden difundirse moléculas hacia o desde la micropartícula. En otras realizaciones, los microportadores son microportadores no porosos. Una micropartícula no porosa se refiere a una micropartícula en la que las moléculas de un tamaño seleccionado no se difunden hacia o desde la micropartícula.

45 Los microportadores para su uso en las composiciones son biocompatibles y tienen una baja toxicidad o nada de toxicidad para las células. Los microportadores adecuados pueden elegirse dependiendo del tejido que va a tratarse, el tipo de daño que va a tratarse, la duración de tratamiento deseada, la longevidad del cultivo celular *in vivo*, y el tiempo requerido para formar los tejidos tridimensionales. Los microportadores pueden comprender diversos polímeros, naturales o sintéticos, cargados (es decir, aniónicos o catiónicos) o no cargados, biodegradables o no biodegradables. Los polímeros pueden ser homopolímeros, copolímeros al azar, copolímeros de bloque, copolímeros de injerto y polímeros ramificados.

50 En algunos aspectos, los microportadores comprenden microportadores no biodegradables. Las microcápsulas y microportadores no biodegradables incluyen, pero no se limitan a, aquellos hechos de polisulfonas, poli(acrilonitrilo-co-cloruro de vinilo), etileno-acetato de vinilo, copolímeros de metacrilato de hidroxietilo-metacrilato de metilo. Estos son útiles para proporcionar propiedades de formación de volumen tisular o en realizaciones donde los microportadores se eliminan por el organismo.

En algunos aspectos, los microportadores comprenden armazones degradables. Estos incluyen microportadores preparados a partir de origen natural, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen, entre otros, fibrina, caseína, albúmina sérica, colágeno, gelatina, lecitina, quitosano, alginato o poli-aminoácidos tales como poli-lisina. En otros aspectos, los microportadores degradables se hacen de polímeros sintéticos, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen, entre otros, polilactida (PLA), poliglicólido (PGA), poli(lactida-co-glicólido) (PLGA), poli(caprolactona), polidioxanona carbonato de trimetileno, polihidroxialcanoatos (*por ejemplo*, poli(hidroxitirato), poli(glutamato de etilo), poli(DTH-iminocarbonil-iminocarbonato de bisfenol A), poli(orto éster), y policianoacrilatos.

En algunos aspectos, los microportadores comprenden hidrogeles, que son típicamente redes poliméricas hidrófilas cargadas con agua. Los hidrogeles tienen la ventaja de desencadenar selectivamente el hinchamiento de polímero. Dependiendo de la composición de la red polimérica, el hinchamiento de la micropartícula puede desencadenarse mediante una variedad de estímulos, incluyendo el pH, fuerza iónica, actividades térmicas, eléctricas, de ultrasonidos y enzimáticas. Ejemplos no limitantes de polímeros útiles en las composiciones de hidrogel incluyen, entre otros, aquellos formados a partir de polímeros de poli(lactida-co-glicólido); poli(N-isopropilacrilamida); poli(ácido metacrílico-g-poli(etilenglicol)); poli(ácido acrílico) y poli(oxipropileno-co-oxietilenglicol); y compuestos naturales tales como sulfato de condroitano, quitosano, gelatina, fibrinógeno, o mezclas de polímeros sintéticos y naturales, por ejemplo quitosano-poli(óxido de etileno). Los polímeros pueden reticularse reversible o irreversiblemente para formar geles adaptables para formar tejidos tridimensionales.

En aspectos a modo de ejemplo, los microportadores o perlas para su uso en la presente invención se componen por completo o se componen parcialmente de dextrano.

De acuerdo con la presente invención, el método de cultivo es aplicable a células del estroma de proliferación, tales como fibroblastos, y particularmente fibroblastos de prepucio neonatales humanos primarios. En diversos aspectos, las células inoculadas sobre el armazón o marco pueden ser células del estroma que comprenden fibroblastos, con o sin otras células, tal como se describe adicionalmente a continuación. Las células son células del estroma que se derivan típicamente del tejido conjuntivo, tales como fibroblastos.

Las células del estroma pueden derivarse de diversos tejidos u órganos, tales como piel, corazón, vasos sanguíneos, médula ósea, músculo esquelético, hígado, páncreas, cerebro, prepucio, que pueden obtenerse mediante biopsia (cuando sea apropiado) o con la autopsia. En un aspecto, pueden obtenerse fibroblastos fetales en una alta cantidad a partir de prepucio, tal como prepucios neonatales.

Las células comprenden fibroblastos, que pueden ser de un origen fetal, neonatal, adulto, o una combinación de los mismos. En algunos aspectos, las células del estroma comprenden fibroblastos fetales, que pueden sustentar el crecimiento de una variedad de células y/o tejidos diferentes. Tal como se usa en el presente documento, un fibroblasto fetal se refiere a fibroblastos derivados de fuentes fetales. Tal como se usa en el presente documento, fibroblasto neonatal se refiere a fibroblastos derivados de fuentes de neonato. En las condiciones apropiadas, los fibroblastos pueden dar lugar a otras células, tales como células óseas, células de gradas, y células del músculo liso y otras células de origen mesodérmico. En algunas realizaciones, los fibroblastos comprenden fibroblastos dérmicos, que son fibroblastos derivados de la piel. Fibroblastos dérmicos humanos normales pueden aislarse a partir de prepucio neonatal. Estas células se crioconservan típicamente al final del cultivo primario.

En otros aspectos, el tejido tridimensional puede prepararse usando células madre o progenitoras, o bien solas o bien en combinación con cualquiera de los tipos celulares tratados en el presente documento. Las células madre y progenitoras incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, células madre embrionarias, células madre hematopoyéticas, células madre neuronales, células madre epidérmicas y células madre mesenquimales.

En algunas realizaciones, un tejido tridimensional "específico" puede prepararse inoculando el armazón tridimensional con células derivadas de un órgano particular, *es decir*, piel, corazón, y/o a partir de un individuo particular que va a recibir más tarde las células y/o tejidos que han crecido en cultivo de acuerdo con los métodos que se describen en el presente documento.

Para determinados usos *in vivo*, es preferible obtener las células del estroma de los tejidos del propio paciente. El crecimiento de células en presencia del marco de soporte del estroma tridimensional puede potenciarse adicionalmente añadiendo al marco, o recubriendo el soporte de marco con proteínas, *por ejemplo*, colágenos, lamininas, fibras elásticas, fibras reticulares, glicoproteínas; glicosaminoglucanos, *por ejemplo*, sulfato de heparina, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, dermatán sulfato, queratán sulfato, etc.; una matriz celular, y/u otros materiales.

Por lo tanto, puesto que los sistemas de cultivo bidimensionales o tridimensionales que se describen en el presente documento son adecuados para el crecimiento de diversos tipos celulares y tejidos, y dependiendo del tejido que va a cultivarse y los tipos de colágeno deseados, las células del estroma apropiadas pueden seleccionarse para inocular el marco.

Aunque los métodos y aplicaciones de la presente invención son adecuados para su uso con diferentes tipos celulares, tales como células específicas de tejido o diferentes tipos de células del estroma tal como se comenta en el presente documento, la derivación de las células para su uso con la presente invención puede ser también específica de la especie. Por consiguiente, pueden generarse composiciones de MEC que son específicas de la especie. Por ejemplo, las células para su uso en la presente invención pueden incluir células humanas. Por ejemplo, las células pueden ser fibroblastos humanos. Asimismo, las células son de otra especie de animal, tal como células equinas (caballo), caninas (perro) o felinas (gato). Adicionalmente, las células de una especie o cepa de especies pueden usarse para generar composiciones de MEC para su uso en otras especies o cepas relacionadas (por ejemplo, alogénicas, singénicas y xenogénicas). Puede apreciarse también que pueden combinarse células derivadas de diversas especies para generar composiciones de MEC de múltiples especies.

Por consiguiente, los métodos y composiciones de la presente invención son adecuados en aplicaciones que implican animales no humanos. Tal como se usa en el presente documento, "veterinaria" se refiere a la ciencia médica referente a o conectada con el tratamiento médico o quirúrgico de animales, especialmente animales domésticos. Los animales veterinarios comunes pueden incluir mamíferos, anfibios, aves, reptiles y peces. Por ejemplo, los mamíferos típicos pueden incluir perros, gatos, caballos, conejos, primates, roedores, y animales de granja, tales como vacas, caballos, cabras, ovejas y cerdos.

Tal como se comentó anteriormente, células adicionales pueden estar presentes en el cultivo con las células del estroma. Estas células adicionales pueden tener varios efectos beneficiosos, que incluyen, entre otros, soportar un crecimiento a largo plazo en cultivo, potenciar la síntesis de factores de crecimiento, y promover la unión de las células al armazón. Los tipos celulares adicionales incluyen como ejemplos no limitantes, células de músculo liso, células de músculo cardiaco, células endoteliales, células de músculo esquelético, células endoteliales, pericitos, macrófagos, monocitos y adipocitos. Tales células pueden inocularse sobre el marco junto con fibroblastos, o en algunos aspectos, en ausencia de fibroblastos. Estas células del estroma pueden derivarse de tejidos u órganos apropiados, que incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación, piel, corazón, vasos sanguíneos, médula ósea, músculo esquelético, hígado, páncreas y cerebro. En otros aspectos, se inoculan uno o más tipos celulares distintos, excluyendo fibroblastos, sobre el armazón. En otros aspectos más, los armazones se inoculan solo con fibroblastos.

Los fibroblastos pueden aislarse fácilmente desagregando un órgano o tejido apropiado que va a servir como fuente de los fibroblastos. Por ejemplo, el tejido u órgano puede desagregarse mecánicamente y/o tratarse con enzimas digestivas y/o agentes quelantes que debilitan las conexiones entre células adyacentes, haciendo posible dispersar el tejido en una suspensión de células individuales sin rotura celular apreciable. La disociación enzimática puede lograrse triturando el tejido y tratando el tejido triturado con cualquiera de un número de enzimas digestivas solas o en combinación. Estas incluyen, pero no se limitan a tripsina, quimiotripsina, colagenasa, elastasa, hialuronidasa, DNasa, pronasa y/o dispasa etc. La rotura mecánica puede lograrse también mediante varios métodos que incluyen, pero sin limitarse al uso de molinillos, mezcladoras, tamices, homogeneizadores, células de presión, o insonadores por nombrar algunos. En un aspecto, se trata tejido de prepucio extirpado usando enzimas digestivas, típicamente colagenasa y/o tripsinasa para desasociar las células de las estructuras de encapsulación.

El aislamiento de fibroblastos, por ejemplo, puede llevarse a cabo tal como sigue: se lavan minuciosamente muestras de tejido reciente y se trituran en solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) con el fin de eliminar el suero. El tejido triturado se incuba de 1-12 horas en una solución recién preparada de una enzima de disociación tal como tripsina. Después de tal incubación, se suspenden las células disociadas, se sedimentan mediante centrifugación y se siembran sobre placas de cultivo. Todos los fibroblastos se unirán antes que otras células, por lo tanto, las células del estroma apropiadas pueden aislarse y hacerse crecer selectivamente. Los fibroblastos aislados pueden entonces hacerse crecer hasta confluencia, recogerse del cultivo confluyente e inocularse sobre el marco tridimensional, véase Naughton et al., 1987, J. Med. 18(3&4):219-250. La inoculación del marco tridimensional con una concentración alta de células del estroma, *por ejemplo*, aproximadamente de 10^6 a 5×10^7 células/ml, dará como resultado el establecimiento del soporte del estroma tridimensional en cortos periodos de tiempo.

Una vez que el tejido se ha reducido a una suspensión de células individuales, la suspensión puede fraccionarse en subpoblaciones de las que pueden obtenerse los fibroblastos y/u otras células del estroma y/o elementos. Esto puede lograrse también usando técnicas convencionales para la separación celular, que incluyen, pero no se limitan a, clonación y selección de tipos celulares específicos, destrucción selectiva de células indeseadas (selección negativa), separación basada en la capacidad de aglutinación celular diferencial en la población mixta, procedimientos de congelación-descongelación, las propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta, filtración, centrifugación convencional y zonal, elutriación centrífuga (centrifugación a contracorriente), separación por gravedad unitaria, distribución en contracorriente, electroforesis y separación celular activada por fluorescencia. Para una revisión de las técnicas de selección clonal y separación celular, véase Freshney, Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques, 2ª Ed., A. R. Liss, Inc., Nueva York, 1987, capítulos 11 y 12, págs. 137-168.

En un aspecto, los fibroblastos aislados pueden hacerse crecer para producir bancos de células. Los bancos de células se crean para permitir iniciar diversas cantidades y programación de lotes de cultivo y para permitir pruebas preventivas de células para detectar contaminantes y características celulares específicas. Los fibroblastos de los

bancos de células se hacen crecer posteriormente para aumentar el número de células hasta niveles apropiados para los armazones de siembra. Las operaciones que implican la exposición medioambiental de las células y materiales que entran en contacto con las células se realizan mediante prácticas asépticas para reducir el potencial de contaminación de los materiales extraños o microbios indeseables.

5 En otro aspecto de la invención, después del aislamiento, las células pueden hacerse crecer a través de varios pases hasta una cantidad adecuada para construir bancos de células maestras. Los bancos de células pueden recogerse entonces, y cargarse en recipientes apropiados y conservarse en condiciones criogénicas. Células en viales congelados procedentes de bancos de células maestras pueden descongelarse y hacerse crecer a través de pases adicionales (habitualmente dos o más). Las células pueden entonces usarse para preparar bancos de células de trabajo criogénicamente conservados.

15 Una etapa de expansión celular usa viales de células en la fase de banco de células de trabajo para aumentar adicionalmente los números de células para inocular armazones o soportes, tales como malla o microportadores. Cada pase es una serie de etapas de subcultivo que incluye inocular soportes de crecimiento celular, incubación, alimentar las células y recoger.

20 El cultivo para bancos de células y expansión celular puede llevarse a cabo inoculando recipientes de cultivo, tales como frascos de cultivo, botellas rotativas o microportadores. Las células del estroma, tales como los fibroblastos, se unen a las superficies de crecimiento previstas y crecen en presencia de medios de cultivo. Los recipientes de cultivo, tales como frascos de cultivo, botellas rotativas y microportadores están configurados específicamente para el cultivo celular y están realizados comúnmente en diversos materiales plásticos cualificados para las aplicaciones previstas. Los microportadores son típicamente perlas microscópicas o macroscópicas y están realizadas típicamente en diversos materiales plásticos. Sin embargo, pueden estar realizados en otros materiales tales como vidrios o materiales de base biológica sólidos/semisólidos tales como colágenos u otros materiales tales como dextrano, un complejo de azúcar modificado tal como se comentó anteriormente.

30 Durante el cultivo, los medios consumidos se sustituyen periódicamente por medios nuevos durante el transcurso del crecimiento celular para mantener una disponibilidad adecuada de los nutrientes y eliminación de productos del cultivo inhibidores (en caso de no preferirse medios condicionados). Los frascos de cultivo y botellas rotativas proporcionan una superficie sobre las que crecen las células y se usan típicamente para cultivar células dependientes de anclaje.

35 En un aspecto, la incubación se realiza en una cámara calentada a 37°C. Topologías de cultivo que requieren comunicación de los medios y el entorno de la cámara usan un 5 % de CO₂ v/v con aire en el espacio del gas de cámara para ayudar en la regulación del pH. Como alternativa, pueden usarse recipientes equipados para mantener la temperatura de cultivo y el pH, tanto para las operaciones de expansión celular y como de producción de MEC. Temperaturas por debajo de 35°C o por encima de 38°C y concentraciones de CO₂ por debajo del 3 % o por encima del 12 % pueden no ser apropiadas.

40 La recogida de células de las superficies de unión puede llevarse a cabo mediante la retirada de los medios de crecimiento y enjuague de las células con una solución salina tamponada para reducir la proteína de competición con enzima, aplicación de enzimas de desasociación, entonces neutralización de las enzimas después de la separación celular. La suspensión celular recogida se recoge y los fluidos recogidos se separan mediante centrifugación. Pueden tomarse muestras de las suspensiones celulares de recogidas de subcultivo para evaluar la cantidad de células recuperadas y otros atributos celulares y se combinan posteriormente con medios nuevos y se aplican como inóculos. El número de pases usado para preparar bancos de células e inóculo de armazón es crítico con respecto a lograr características de MEC aceptables.

50 Después de prepararse un armazón apropiado, se inocula mediante siembra con las células del estroma preparadas. La inoculación del armazón puede realizarse en una variedad de modos, tales como sedimentación. La malla preparada para el cultivo de MEC en condiciones aeróbicas se prepara de la misma manera que para una malla que ha crecido en condiciones hipóxicas con la excepción de que no se usa una cámara anaeróbica para crear las condiciones hipóxicas.

55 Por ejemplo, para ambas mallas preparadas para el cultivo de MEC en condiciones tanto aeróbicas como hipóxicas, la malla preparada y esterilizada se coloca en placas de Petri estériles de 150 mm de diámetro x 15 mm de profundidad y se aplicaron hasta un espesor de aproximadamente 10 piezas. Las pilas de malla se inoculan entonces mediante sedimentación. Las células se añaden a medios nuevos para obtener la concentración apropiada de células para el inóculo. El inóculo se añade a la pila de malla donde las células se depositan sobre las fibras de nailon y se unen mientras se encuentran en condiciones de incubación. Después de un tiempo adecuado, las láminas de malla sembradas individualmente pueden separarse de manera aséptica de la pila y colocarse individualmente en placas de Petri separadas de 150 mm x 15 mm que contienen aproximadamente 50 ml de medios de crecimiento.

65

La incubación del cultivo inoculado se realiza en condiciones hipóxicas, lo que se descubre que produce una MEC y medios circundantes con propiedades únicas en comparación con la MEC generada en condiciones de cultivo normales. Tal como se usa en el presente documento, las condiciones hipóxicas se caracterizan por una concentración de oxígeno baja en comparación con la concentración de oxígeno del aire ambiente (aproximadamente un 15 %-25 % de oxígeno). En un aspecto, las condiciones hipóxicas se caracterizan por una concentración de oxígeno menor de aproximadamente un 10 %. Las condiciones hipóxicas se caracterizan por una concentración de oxígeno de aproximadamente el 0,1 % al 10 %, del 1 % al 10 %, del 1% al 9%, del 1% al 8%, del 1% al 7%, del 1% al 6%, del 1% al 5%, del 1% al 4%, del 1 % al 3 %, o del 1 % al 2 %. En un aspecto determinado, el sistema mantiene aproximadamente un 1-3% de oxígeno dentro del recipiente de cultivo. Las condiciones hipóxicas pueden crearse y mantenerse usando un aparato de cultivo que permita controlar las concentraciones de gas ambiente, por ejemplo, una cámara anaeróbica.

La incubación de cultivos celulares se realiza típicamente en atmósfera normal con un 15-22 % de oxígeno y un 5 % de CO₂ para la expansión y la siembra, momento en el que los cultivos de bajo contenido en oxígeno se dividen a una cámara hermética que se inunda con el 95 % de nitrógeno/5 % de CO₂ de modo que se crea un entorno hipóxico dentro del medio de cultivo.

Por ejemplo, placas de Petri con malla cultivada para producir MEC en condiciones hipóxicas se hacen crecer inicialmente en incubación a 37°C y un 95 % de aire/5 % de CO₂ durante 2-3 semanas. Después del periodo de cultivo casi atmosférico, las placas de Petri de malla se incuban en una cámara diseñada para el cultivo anaeróbico que se purga con una mezcla de gases de aproximadamente un 95 % de nitrógeno y un 5 % de CO₂. Los medios de crecimiento consumidos se sustituyen con medios nuevos al nivel del oxígeno atmosférico a lo largo del periodo de cultivo y después de intercambiarse los medios las placas de Petri cargadas con malla se colocan en la cámara anaeróbica, la cámara se purga con un 95 % de nitrógeno/5 % de CO₂, entonces se incuban a 37°C. Las mallas cultivadas se recogen cuando alcanzan el tamaño deseado o contienen los componentes biológicos deseados.

Durante el periodo de incubación, las células del estroma crecerán linealmente a lo largo y envolverán el marco tridimensional antes de comenzar a crecer hacia el interior de las aberturas del marco. Las células en crecimiento producen una miríada de factores de crecimiento, factores reguladores y proteínas, algunos de los cuales se secretan en los medios circundantes, y otros que se depositan sobre el soporte para constituir la MEC que se comenta de manera más completa a continuación. Factores de crecimiento y reguladores pueden añadirse al cultivo, pero no son necesarios. El cultivo de las células del estroma produce tanto fracciones no solubles como fracciones solubles. Las células se hacen crecer hasta un grado apropiado para permitir la deposición adecuada de proteínas de MEC.

Durante el cultivo de los tejidos tridimensionales, las células que proliferan pueden liberarse del marco y pegarse a las paredes del recipiente de cultivo donde pueden seguir proliferando y formar una monocapa confluyente. Para minimizar esta aparición, que puede afectar al crecimiento de células, las células liberadas pueden retirarse durante la alimentación o transfiriendo el cultivo celular tridimensional a un nuevo recipiente de cultivo. La retirada de la monocapa confluyente o transferencia del tejido cultivado a medios nuevos en un nuevo recipiente mantiene o restablece la actividad proliferativa de los cultivos tridimensionales. En algunos aspectos, la retirada o transferencia pueden realizarse en un recipiente de cultivo que tiene una monocapa de células cultivadas que supera el 25 % de confluencia. Como alternativa, el cultivo en algunas realizaciones se agita para impedir que las células liberadas se peguen; en otras, se infunden medios nuevos de manera continua a través del sistema. En algunos aspectos, dos o más tipos celulares pueden cultivarse juntos o bien al mismo tiempo o bien uno primero seguido por el segundo (*por ejemplo*, fibroblastos y células del músculo liso o células endoteliales).

Después de la inoculación de los armazones tridimensionales, el cultivo celular se incuban en un medio nutriente apropiado y condiciones de incubación que sustentan el crecimiento de células hacia el interior de los tejidos tridimensionales. Muchos medios comercialmente disponibles tales como medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), RPMI 1640, Fisher's, Iscove's, y McCoy's, pueden ser adecuados para soportar el crecimiento de los cultivos celulares. El medio puede complementarse con sales adicionales, fuentes de carbono, aminoácidos, suero y componentes del suero, vitaminas, minerales, agentes reductores, agentes tamponadores, lípidos, nucleósidos, antibióticos, factores de unión y factores de crecimiento. Las formulaciones para diferentes tipos de medios de cultivo se describen en diversos trabajos de referencia disponibles para el experto en la materia (por ejemplo, *Methods for Preparation of Media, Supplements and Substrates for Serum Free Animal Cell Cultures*, Alan R. Liss, Nueva York (1984); *Tissue Culture: Laboratory Procedures*, John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra (1996); *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Techniques*, 4^a Ed., Wiley-Liss (2000)).

Los medios de crecimiento o de cultivo usados en cualquiera de las etapas de cultivo de la presente invención, ya sea en condiciones aeróbicas o hipóxicas, pueden incluir suero, o estar libres de suero. En un aspecto, los medios son medio Eagle modificado por Dulbecco con glucosa 4,5 g/l, alanil-L-glutamina, Eq 2 mM, y complementado nominalmente con suero bovino fetal al 10 %. En otro aspecto, los medios son medios libres de suero y es medio Eagle modificado por Dulbecco con glucosa 4,5 g/l, medio base con Glutamax®, complementado con albúmina sérica al 0,5 %, heparina 2 µg/ml, FGF básico recombinante 1 µg/ml, inhibidor de tripsina de soja 1 µg/ml, 1Xcomplemento ITS (insulina-transferrina-selenio, n.º de cat. de Sigma I3146), complemento de ácido graso diluido

1:1000 (n.º de cat. de Sigma 7050), y colesterol diluido 1:1000. Adicionalmente, los mismos medios pueden usarse para el cultivo tanto hipóxico como aeróbico. En un aspecto, los medios de crecimiento se cambian de medios a base de suero a medios libres de suero después de la siembra y la primera semana de crecimiento.

5 Las condiciones de incubación serán en condiciones apropiadas de pH, temperatura, y gas (*por ejemplo*, O₂, CO₂, etc.) para mantener una condición de crecimiento hipóxica. En algunas realizaciones, el cultivo celular tridimensional puede suspenderse en el medio durante el periodo de incubación, con el fin de maximizar la actividad proliferativa y generar factores que facilitan las actividades biológicas deseadas de las fracciones. Además, el cultivo puede "alimentarse" periódicamente para retirar los medios gastados, despoblar las células liberadas, y añadir nueva fuente de nutrientes. Durante el periodo de incubación, las células cultivadas crecen linealmente a lo largo y envuelven los filamentos del armazón tridimensional antes de comenzar a crecer hacia el interior de las aberturas del armazón.

15 Durante la incubación en condiciones hipóxicas, en comparación con la incubación en condiciones de oxígeno atmosférico normales de aproximadamente un 15-20 %, miles de genes se expresan de manera diferencial. Se ha descubierto que varios genes regulan por incremento o regulan por disminución en tales composiciones, más notablemente ciertas especies de laminina, especies de colágeno y factores de Wnt. En diversos aspectos, la MEC tridimensional puede definirse por la huella característica o el conjunto de productos celulares producidos por las células debido al crecimiento en condiciones hipóxicas en comparación con el crecimiento en condiciones normales. En las composiciones de MEC mostradas a modo de ejemplo específicamente en el presente documento, los tejidos tridimensionales y medios circundantes se caracterizan por la expresión y/o secreción de diversos factores.

25 Los tejidos tridimensionales y composiciones que se describen en el presente documento tienen una MEC que está presente sobre el armazón o marco. En algunos aspectos, la MEC incluye diversos tipos de laminina y colágeno debido al crecimiento en condiciones hipóxicas y la selección de células que crecen sobre el soporte. Las proporciones de proteínas de MEC depositadas puede manipularse o potenciarse seleccionando fibroblastos que elaboran el tipo de colágeno apropiado así como haciendo crecer las células en condiciones hipóxicas en las que la expresión de laminina específica y especies de colágeno se regulan por incremento o regulan por disminución.

30 La selección de fibroblastos puede lograrse en algunos aspectos usando anticuerpos monoclonales de un isotipo o subclase apropiado que definen tipos de colágeno particulares. En otros aspectos, sustratos sólidos, tales como perlas magnéticas, pueden usarse para seleccionar o eliminar células que tienen anticuerpo unido. La combinación de estos anticuerpos puede usarse para seleccionar (positiva o negativamente) los fibroblastos que expresan el tipo de colágeno deseado. Como alternativa, el estroma usado para inocular el marco puede ser una mezcla de células que sintetizan los tipos de colágeno deseados. La distribución y los orígenes del tipo de colágeno a modo de ejemplo se muestran en la Tabla I.

Tabla 1. Distribuciones y orígenes de diversos tipos de colágeno

Tipo de colágeno	Principio Distribución de tejido	Células de origen
I	Tejido conjuntivo ordinario laxo y denso; fibras de colágeno	fibroblastos y células reticulares; células de músculo liso
	fibrocartilago	
	hueso	osteoblastos
	dentina	odontoblastos
II	hialina y cartilago elástico	condrocitos
	cuerpo vítreo del ojo	células retinianas
III	tejido conjuntivo laxo; fibras reticulares	fibroblastos y células reticulares
	capa papilar de la dermis	células de músculo liso; células endoteliales
	vasos sanguíneos	
IV	membranas basales	células epiteliales y endoteliales
	cápsula de cristalino del ojo	fibras de cristalino
V	membranas fetales; placenta	fibroblastos
	membranas basales	
	hueso	
	músculo liso	células de músculo liso

ES 2 667 265 T3

Tipo de colágeno	Principio Distribución de tejido	Células de origen
IV	membranas basales	células epiteliales y endoteliales
	cápsula de cristalino del ojo	fibra de cristalino
V	membranas fetales; placenta	fibroblastos
	membranas basales	
	hueso	
	músculo liso	células de músculo liso
VI	tejido conjuntivo	fibroblastos
VII	membranas basales epiteliales	fibroblastos
	fibrillas de anclaje	queratinocitos
VIII	córnea	fibroblastos corneales
IX	cartílago	
X	cartílago hipertrófico	
XI	cartílago	
XII	dermis papilar	fibroblastos
XIV (undulina)	dermis reticular	fibroblastos
XVII	antígeno de penfigoide ampolloso P 170	queratinocitos

Tipos adicionales de colágeno que pueden estar presentes en composiciones de MEC se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Tipos de colágeno y gen(es) correspondiente(s)

Tipo de colágeno	Gen(es)
I	COL1A1, COL1A2
II	COL2A1
III	COL3A1
IV	COL4A1, COL4A2, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL4A6
V	COL5A1, COL5A2, COL5A3
VI	COL6A1, COL6A2, COL6A3
VII	COL7A1
VIII	COL8A1, COL8A2
IX	COL9A1, COL9A2, COL9A3
X	COL10A1
XI	COL11A1, COL11A2
XII	COL12A1
XIII	COL13A1
XIV	COL14A1
XV	COL15A1
XVI	COL16A1
XVII	COL17A1
XVIII	COL18A1

Tipo de colágeno	Gen(es)
XIX	COL19A1
XX	COL20A1
XXI	COL21A1
XXII	COL22A1
XXIII	COL23A1
XXIV	COL24A1
XXV	COL25A1
XXVI	EMID2
XXVII	COL27A1
XXVIII	COL28A1

Tal como se comentó anteriormente, las composiciones de MEC que se describen en el presente documento incluyen diversos colágenos. Tal como se muestra en la Tabla 3 del Ejemplo 1, se encuentra que la expresión de varias especies de colágeno está regulada por incremento en composiciones de MEC cultivadas en condiciones hipóxicas. Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, la composición de MEC que incluye una o más proteínas embrionarias, incluye la regulación por incremento de especies de colágeno en comparación con la producida en condiciones de oxígeno de aproximadamente un 15-20 % de oxígeno. En otro aspecto, las especies de colágeno reguladas por incremento son tipo V alfa 1; IX alfa 1; IX alfa 2; VI alfa 2; VIII alfa 1; IV alfa 5; VII alfa 1; XVIII alfa 1; y XII alfa 1.

Además de diversos colágenos, la composición de MEC que se describe en el presente documento incluye diversas lamininas. Las lamininas son una familia de heterotrímeros de glicoproteína compuestos por una subunidad de cadena alfa, beta y gamma unidas entre sí a través de un dominio de hélice superenrollada. Hasta la fecha, se ha identificado que las cadenas de laminina 5 alfa, 4 beta y 3 gamma se combinan para formar 15 isoformas diferentes. Dentro de esta estructura se encuentran dominios identificables que poseen actividad de unión hacia otras moléculas de laminina y lámina basal, y receptores unidos a membrana. Los dominios VI, IVb, y IVa forman estructuras globulares, y los dominios V, IIIb, y IIIa (que contienen elementos de tipo EGF ricos en cisteína) forman estructura de tipo barra. Los dominios I y II de las tres cadenas participan en la formación de una estructura de hélice superenrollada de triple hebra (la rama larga).

Las cadenas de laminina poseen funciones compartidas y únicas y se expresan con patrones temporales (de desarrollo) y espaciales (específicos de tejido) específicos. Se considera que las cadenas alfas de laminina son la porción funcionalmente importante de los heterotrímeros, ya que muestran patrones de distribución específicos de tejido y contienen los sitios de interacción celular principales. Es sabido que el endotelio vascular expresa dos isoformas de laminina, con expresión variada dependiendo de la fase de desarrollo, el tipo de vaso, y el estado de activación del endotelio.

Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, la composición de MEC que incluye una o más proteínas embrionarias, incluye regulación por incremento o regulación por disminución de diversas especies de laminina en comparación con las producidas en condiciones de oxígeno de aproximadamente un 15-20 % de oxígeno.

Laminina 8, se compone de cadenas alfa-4, beta-1 y gamma-1 de laminina. La cadena alfa-4 de laminina está ampliamente distribuida tanto en adultos como durante el desarrollo. En los adultos puede identificarse en la membrana basal que rodea fibras de músculo cardíaco, esquelético y liso, y en tabiques alveolares pulmonares. Es sabido que existe en la membrana basal endotelial tanto en capilares y vasos más grandes, y en la membrana basal perineural de nervios periféricos, así como en espacios intersinusoidales, arterias grandes, y arteriolas más pequeñas de médula ósea. La laminina 8 es una isoforma de laminina principal en el endotelio vascular que se expresa y adhiere a las plaquetas y se sintetiza en adipocitos 3T3-L1, mostrando que su nivel de síntesis aumenta con la conversión adiposa de las células. Se cree que la laminina 8 es la isoforma de laminina expresada generalmente en linajes de células mesenquimales para inducir microvasos en los tejidos conjuntivos. La laminina 8 se ha identificado también en cultivos celulares primarios de médula ósea de ratón, paredes de arteriolas, y espacios intersinusoidales donde es la isoforma de laminina principal en la médula ósea en desarrollo. Debido a su localización en la médula ósea de adulto adyacente a células hematopoyéticas, es probable que las isoformas de laminina que contienen la cadena alfa-4 tengan interacciones biológicamente relevantes con células hematopoyéticas en desarrollo.

Por consiguiente, en otro aspecto de la presente invención, la MEC incluye la regulación por incremento de especies de laminina, tales como laminina 8. En otro aspecto, las lamininas producidas por los tejidos tridimensionales de la presente invención, incluyen al menos laminina 8, que define una característica o distintivo de las proteínas lamininas presentes en la composición.

5 Las composiciones de MEC que se describen en el presente documento pueden incluir diversos factores de Wnt. Los factores de la familia Wnt son moléculas de señalización que tienen papeles en una miríada de rutas celulares y procesos de interacción célula-célula. La señalización de Wnt se ha implicado en la tumorigénesis, patrones mesodérmicos tempranos del embrión, morfogénesis del cerebro y riñones, regulación de la proliferación de la glándula mamaria, y enfermedad de Alzheimer. Tal como se muestra en la Tabla 4 del Ejemplo 1, se encuentra que la expresión de varias especies de proteínas Wnt está regulada por incremento en composiciones de MEC cultivadas en condiciones hipóxicas. Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, la composición de MEC que incluye una o más proteínas embrionarias, incluye la regulación por incremento de especies Wnt en comparación con la producida en condiciones de oxígeno de aproximadamente un 15-20 % de oxígeno. En otro aspecto, las especies de Wnt reguladas por incremento son wnt 7a y wnt 11. En otro aspecto, los factores de Wnt producidos por los tejidos tridimensionales de la presente invención, incluyen al menos wnt7a, y wnt11, que define una característica o distintivo de las proteínas Wnt presentes en la composición.

20 Se mostrado también que los métodos de cultivo descritos en el presente documento, que incluyen cultivo en condiciones hipóxicas, regulan por incremento la expresión de diversos factores de crecimiento. Por consiguiente, Las composiciones de MEC que se describen en el presente documento pueden incluir diversos factores de crecimiento, tales como un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Tal como se usa en el presente documento, un VEGF pretende incluir todos los miembros conocidos de la familia de VEGF. Los VEGF son una subfamilia de factores de crecimiento, más específicamente de la familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas de factores de crecimiento de nudo de cistina. Los VEGF tienen un papel muy conocido tanto en la vasculogénesis como angiogénesis. Se conocen varios VEGF, incluyendo VEGF-A, que era conocido anteriormente como VEGF antes del descubrimiento de otras especies de VEGF. Otras especies de VEGF incluyen el factor de crecimiento placentario (PIGF), VEGF-B, VEGFC y VEGF-D. Adicionalmente, son bien conocidas varias isoformas de VEGF humano.

30 De acuerdo con la producción aumentada de proteínas Wnt así como factores de crecimiento mediante cultivo en condiciones hipóxicas tal como se describe en el presente documento, la presente invención proporciona además un método de producción de una proteína Wnt y un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El método puede incluir cultivar células en condiciones hipóxicas tal como se describe en el presente documento, sobre un soporte tridimensional en un medio de crecimiento adecuado, para producir la proteína Wnt y el VEGF. En un aspecto a modo de ejemplo, las especies de Wnt son wnt 7a y wnt 11 y el VEGF es VEGF-A. Las proteínas pueden procesarse adicionalmente o recogerse tal como se describe adicionalmente en el presente documento o mediante métodos conocidos en la técnica.

40 Tal como se ha comentado a fondo, las composiciones de MEC de la presente invención incluyen fracciones tanto solubles como no solubles o cualquier porción de las mismas. Ha de entenderse que las composiciones de la presente invención pueden incluir cualquiera de las fracciones o ambas fracciones, así como cualquier combinación de las mismas. Adicionalmente, los componentes individuales pueden aislarse de las fracciones que van a usarse individualmente o en combinación con otros aislados o composiciones conocidas.

45 Por consiguiente, en diversos aspectos, las composiciones de MEC producidas que usan los métodos descritos en el presente documento pueden usarse directamente o procesarse en diversos modos, métodos que pueden aplicarse tanto a las fracciones no solubles como a las fracciones solubles. La fracción soluble, incluyendo el sobrenadante libre de células y medios, puede someterse a liofilización para conservar y/o concentrar los factores. Diversos conservantes, crioprotectores y agentes estabilizantes biocompatibles pueden usarse para conservar la actividad cuando donde se requiera. Los ejemplos de agentes biocompatibles incluyen, entre otros, glicerol, dimetilsulfóxido y trehalosa. El liofilizado puede tener también uno o más excipientes tales como tampones, agentes de formación de volumen y modificadores de tonicidad. Los medios liofilizados pueden reconstituirse mediante adición de una solución adecuada o diluyente farmacéutico, tal como se describe adicionalmente a continuación.

55 En otros aspectos, se dializa la fracción soluble. La diálisis es una de las técnicas usadas más comúnmente para separar los componentes de la muestra basándose en la difusión selectiva a través de una membrana porosa. El tamaño de poro determina el punto de corte del peso molecular (MWCO) de la membrana que se caracteriza por el peso molecular al que el 90 % del soluto se retiene por la membrana. En ciertos aspectos se contemplan membranas con cualquier tamaño de poro dependiendo del punto de corte deseado. Los puntos de corte típicos son 5.000 daltons, 10.000 daltons, 30.000 daltons y 100.000 daltons, sin embargo se contemplan todos los tamaños.

60 En algunos aspectos, la fracción soluble puede procesarse precipitando los componentes activos (por ejemplo, factores de crecimiento) en los medios. La precipitación puede usar diversos procedimientos, tales como desestabilización salina con sulfato de amonio o uso de polímeros hidrófilos, por ejemplo polietilenglicol.

65

En otros aspectos, la fracción soluble se somete a filtración usando diversos filtros selectivos. Procesar la fracción soluble mediante filtración es útil para concentrar los factores presentes en la fracción y también retirar pequeñas moléculas y solutos usados en la fracción soluble. Filtros con selectividad para pesos moleculares especificados incluyen <5000 daltons, <10.000 daltons y <15.000 daltons. Pueden usarse otros filtros y someterse a ensayo los medios procesados para determinar la actividad terapéutica tal como se describe en el presente documento. Los filtros y sistema de concentrador a modo de ejemplo incluyen aquellos a base de, entre otros, filtros de fibra, discos de filtro y sondas de filtro (véase, por ejemplo, Amicon Stirred Ultrafiltration Cells).

En otros aspectos más, la fracción soluble se somete a cromatografía para retirar las sales, impurezas, o fraccionar diversos componentes del medio. Pueden emplearse diversas técnicas cromatográficas, tales como tamizado molecular, intercambio de iones, técnicas cromatográficas de fase inversa y de afinidad. Para procesar un medio condicionado sin pérdida significativa de bioactividad, pueden usarse medios cromatográficos suaves. Los ejemplos no limitantes incluyen, entre otros, dextrano, agarosa, medios de separación a base de poli(acrilamida) (por ejemplo, disponibles con diversos nombres comerciales, tales como Sephadex, Sepharose y Sephacryl).

En otros aspectos más, los medios condicionados se formulan como liposomas. Los factores de crecimiento pueden introducirse o encapsularse en la luz de liposomas por el suministro y para prolongar el tiempo de vida de los factores activos. Como se conoce en la técnica, los liposomas pueden clasificarse en diversos tipos: vesículas multilaminares (MLV), vesículas estables plurilaminares (SPLV), vesículas pequeñas unilaminares (SUV) o vesículas grandes unilaminares (LUV). Los liposomas pueden prepararse a partir de diversos compuestos lipídicos, que pueden ser sintéticos o de origen natural, incluyendo fosfatidil éteres y ésteres, tales como fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidil etanolamina, fosfatidilinositol, dimiristoilfosfatidilcolina; esteroides tales como colesterol; cerebrósidos; esfingomielina; glicerolípidos; y otros lípidos (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.833.948).

La fracción soluble puede usarse directamente sin aditivos adicionales o prepararse como composiciones farmacéuticas con diversos excipientes, vehículos o portadores farmacéuticamente aceptables. Una "composición farmacéutica" se refiere a una forma de las fracciones solubles y/o no solubles y al menos un vehículo, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Para la administración intradérmica, subcutánea o intramuscular, las composiciones pueden prepararse en suspensión estéril, soluciones o emulsiones de las composiciones de MEC en vehículos acuosos u oleosos. Las composiciones pueden contener también agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilización o dispersión. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosis unitaria, ampollas en envases de múltiples dosis, con o sin conservantes. Como alternativa, las composiciones pueden presentarse en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado que incluye, a modo de ejemplo y no de limitación, agua apirógena estéril, solución salina, tampón, o solución de dextrosa.

En otros aspectos, los tejidos tridimensionales son preparaciones crioconservadas, que se descongelan antes del uso. Los crioconservantes farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, glicerol, sacáridos, polioles, metilcelulosa y dimetilsulfóxido. Los agentes sacáridos incluyen monosacáridos, disacáridos y otros oligosacáridos con temperatura de transición vítrea de la solución concentrada congelada al máximo (T_g) que es al menos -60,-50,-40,-30,-20,-10, o 0 °C. Un sacárido a modo de ejemplo para su uso en la crioconservación es trehalosa.

En algunos aspectos, los tejidos tridimensionales se tratan para destruir las células antes del uso. En algunos aspectos, la MEC depositada sobre los armazones puede recogerse y procesarse para su administración (véanse las patentes de los Estados Unidos con n.º 5.830.708 y 6.280.284).

En otras realizaciones, el tejido tridimensional puede concentrarse y lavarse con un medio farmacéuticamente aceptable para su administración. En la técnica se encuentran disponibles diversas técnicas para concentrar las composiciones, tales como centrifugación o filtración. Los ejemplos incluyen, sedimentación de dextrano y centrifugación diferencial. La formulación de los tejidos tridimensionales puede implicar también ajustar la fuerza iónica de la suspensión hasta isotonicidad (*es decir*, aproximadamente de 0,1 a 0,2) y hasta pH fisiológico (*es decir*, pH 6,8 a 7,5). La formulación puede contener también lubricantes u otros excipientes para ayudar a la administración o estabilidad de la suspensión celular. Estos incluyen, entre otros, sacáridos (por ejemplo, maltosa) y polímeros orgánicos, tales como polietilenglicol y ácido hialurónico.

Tal como se ha tratado anteriormente, las composiciones de MEC de la presente invención pueden procesarse de varios modos dependiendo de la aplicación anticipada y suministro o administración apropiada de la composición de MEC. Por ejemplo, las composiciones pueden suministrarse como armazones tridimensionales o implantes, o las composiciones pueden formularse para inyección tal como se describe anteriormente. Los términos "administración" o "administrar" se definen como que incluyen un acto de proporcionar un compuesto o composición farmacéutica de la invención a un sujeto que necesita tratamiento. Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usa en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal e infusión. Las expresiones "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y

"administrado por vía periférica" tal como se usa en el presente documento significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material distinto de directamente en el sistema nervioso central, de manera que entra en el sistema del sujeto y, por lo tanto, se somete al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier individuo o paciente o animal en el que se realizan los métodos objeto. Generalmente, el sujeto es humano, aunque como apreciarán los expertos en la materia, el sujeto puede ser un animal. Así otros animales, incluyendo mamíferos tales como roedores (incluyendo ratones, ratas, hámsteres y cobayas), gatos, perros, conejos, animales de granja incluyendo vacas, caballos, cabras, ovejas, cerdos, etc., y primates (incluyendo monos, chimpancés, orangutanes y gorilas) se incluyen en la definición de sujeto.

Tal como se ha tratado anteriormente, factores de crecimiento u otros agentes biológicos que inducen o estimulan el crecimiento de células particulares pueden incluirse en las composiciones de MEC de la presente invención. El tipo de factores de crecimiento dependerá del tipo celular y la aplicación para la que está prevista la composición. Por ejemplo, en el caso de células osteocondrales, pueden estar presentes agentes bioactivos adicionales tales como factores de crecimiento celulares (*por ejemplo*, TGF- β), sustancias que estimulan la condrogénesis (*por ejemplo*, BMP que estimulan la formación de cartílago tal como BMP-2, BMP-12 y BMP-13), factores que estimulan la migración de células del estroma al almacén, factores que estimulan la deposición de matriz, anti-inflamatorios (*por ejemplo*, anti-inflamatorios no esteroideos), inmunosupresores (*por ejemplo*, ciclosporinas). Pueden incluirse también otras proteínas, tales como otros factores de crecimiento tales como factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de tipo insulina (IGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento celular endotelial humano (ECGF), factor estimulante de las colonias de granulocitos (GM-CSF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), proteína morfogenética derivada de cartílago (CDMP), otras proteínas morfogenéticas óseas tales como OP-1, OP-2, BMP3, BMP4, BMP9, BMP11, BMP14, DPP, Vg-1, 60A y Vgr-1, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares, glicoproteínas o glicosaminoglicanos, tales como sulfato de heparina, condroitín-4-sulfato, condroitín-6-sulfato, dermatán sulfato, queratín sulfato, etc. Por ejemplo, se ha encontrado que factores de crecimiento tales como FGF- β , con ascorbato, desencadenan la diferenciación de condrocitos y la formación de cartílago mediante condrocitos. Además, el ácido hialurónico es un buen sustrato para la unión de condrocitos y otras células del estroma y puede incorporarse como parte del almacén o aplicarse como recubrimiento sobre el almacén.

Adicionalmente, pueden usarse también otros factores que influyen en el crecimiento y/o la actividad de células particulares. Por ejemplo, en el caso de los condrocitos, puede añadirse un factor tal como una condroitinasa que estimula la producción de cartílago mediante condrocitos a la matriz con el fin de mantener condrocitos en un estado hipertrófico tal como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 2002/0122790. En otro aspecto, los métodos de la presente invención incluyen la presencia de alginatos polisulfatados u otros polisacáridos polisulfatados tales como ciclodextrina polisulfatada y/o inulina polisulfatada, u otros componentes capaces de estimular la producción de MEC de células de tejido conjuntivo tal como se describe en la publicación de patente internacional con n.º WO 2005/054446.

La célula o el tejido que va a repararse y/o regenerarse puede ponerse en contacto *in vivo* o *in vitro* mediante cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, las composiciones de MEC pueden inyectarse o implantarse (por ejemplo, a través de tejido de MEC, un parche o dispositivo recubierto de la presente invención) en el sujeto. En otro aspecto, el tejido o las células que van a repararse y/o regenerarse pueden recogerse del sujeto y cultivarse *in vitro* y posteriormente implantarse o administrarse al sujeto usando técnicas quirúrgicas conocidas.

Tal como se ha tratado anteriormente, las composiciones de MEC de la presente invención pueden procesarse en una variedad de modos. Por consiguiente, en una realización, la presente invención incluye un sistema de cultivo tisular. En diversos aspectos, el sistema de cultivo se compone de las composiciones de MEC que se describe en el presente documento. Las composiciones de MEC de la presente invención pueden incorporarse en el sistema de cultivo tisular en una variedad de modos. Por ejemplo, las composiciones pueden incorporarse como recubrimientos, impregnando materiales de almacén tridimensional tal como se describe en el presente documento, o como aditivos en medios para cultivar células. Por consiguiente, en un aspecto, el sistema de cultivo puede incluir materiales de soporte tridimensional impregnados con cualquiera de las composiciones de MEC que se describen en el presente documento, tales como factores de crecimiento o proteínas embrionarias.

Las composiciones de MEC que se describen en el presente documento pueden servir como soporte o soporte tridimensional para el crecimiento de diversos tipos celulares. Se contempla cualquier tipo celular capaz de cultivo celular. En un aspecto, el sistema de cultivo puede usarse para soportar el crecimiento de células madre. En otro aspecto, las células madre son células madre embrionarias, células madre mesenquimales o células madre neuronales.

El sistema de cultivo tisular puede usarse para generar composiciones de MEC adicionales, tales como tejido implantable. Por consiguiente, el cultivo de células usando el sistema de cultivo tisular de la presente invención

puede realizarse *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, el sistema de cultivo tisular de la presente invención puede usarse para generar composiciones de MEC para inyección o implantación en un sujeto. Las composiciones de MEC generadas por el sistema de cultivo tisular pueden procesarse y usarse en cualquier método que se describe en el presente documento.

5 Las composiciones de MEC de la presente invención, incluyendo células y composiciones de tejido tridimensional, pueden usarse para promover y/o sustentar el crecimiento de células *in vivo*.

10 Composiciones de células apropiadas (por ejemplo, células de MEC aisladas de la presente invención y/o agentes biológicos adicionales) pueden administrarse antes, después o mientras se implantan o administran las composiciones de MEC. Por ejemplo, las células pueden sembrarse en el sitio de administración, defecto y/o implantación antes de que el sistema de cultivo o vehículo de suministro biológico se implante en el sujeto. Como alternativa, las composiciones de células apropiadas pueden administrarse después (*por ejemplo*, mediante inyección en el sitio). Las células actúan allí para inducir regeneración tisular y/o reparación celular. Las células pueden sembrarse mediante cualquier medio que permita la administración de las células al sitio del defecto, por ejemplo, mediante inyección. La inyección de las células puede ser mediante cualquier medio que mantiene la viabilidad de las células, tales como, mediante jeringa o artroscopia.

20 En otra realización, la presente invención incluye diversos dispositivos implantables y parches de regeneración tisular que incluyen las composiciones de MEC que se describen en el presente documento que permiten beneficios, tales como increscencia tisular. Tal como se comenta en el presente documento, las composiciones de MEC pueden servir como recubrimientos sobre dispositivos médicos, tales como parches u otros dispositivos implantables. En diversos aspectos, tales dispositivos son útiles para la reparación de heridas, reparación de hernias, reparación del suelo pélvico (por ejemplo, prolapso de órganos pélvicos), reparación de manguito de los rotadores y similares. En aspectos relacionados, los recubrimientos son útiles para implantes ortopédicos, implantes cardiovasculares, eslingas urinarias y eslingas de marcapasos.

30 Por ejemplo, la manifestación básica de una hernia es una protrusión del contenido abdominal en un defecto dentro de la fascia. Los enfoques quirúrgicos hacia la reparación de hernias se centran en reducir el contenido de la hernia dentro de la cavidad peritoneal y producir un cierre firme del defecto de la fascia o bien usando materiales protésicos, alogénicos o autógenos. Se han usado varias técnicas usadas para producir este procedimiento, sin embargo, los inconvenientes de los productos y procedimientos actuales incluyen reaparición de la hernia, cuando el cierre se debilita de nuevo, dejando que el contenido abdominal vuelva al defecto. En la herniorrafia, podría usarse un parche de regeneración tisular correctivo, tal como una malla biorreabsorbible o sintética recubierta con composiciones de MEC.

40 En la técnica se conoce una variedad de técnicas para aplicar recubrimientos biológicos a las superficies del dispositivo médico que pueden utilizarse. Por ejemplo, las composiciones de MEC pueden recubrirse usando reticuladores fotoactivos permitiendo la unión covalente permanente a las superficies del dispositivo con la activación del reticulador aplicando radiación ultravioleta. Un reticulador a modo de ejemplo es el reticulador TriLite™, que se ha mostrado que es no citotóxico, no irritante para el tejido biológico y no sensibilizante. Los materiales de MEC pueden no separarse o separarse en los componentes individuales, tales como colágenos humanos, ácido hialurónico (HA), fibronectina, y similares antes del recubrimiento o incorporación en diversos dispositivos implantables. Además, factores de crecimiento adicionales y similares pueden incorporarse para permitir características de implantación beneficiosas, tales como una infiltración celular mejorada.

50 En diversas realizaciones relacionadas, la presente invención proporciona métodos y dispositivos aplicables en aplicaciones cosméticas/aplicaciones cosmeceúticos. En diversas aplicaciones cosméticas, las composiciones pueden formularse como formulaciones apropiadas, tales como formulaciones inyectables y tópicas. Tal como se comentó adicionalmente en los Ejemplos incluidos en el presente documento, las composiciones de MEC formuladas como composiciones tópicas han demostrado ser efectivas en diversas aplicaciones estéticas de la piel, tales como aplicaciones antiarrugas, antienvjecimiento así como un medio auxiliar a la cirugía con láser ablativo. Se han mostrado varias características beneficiosas de MEC que contiene composiciones tópicas. Tales beneficios incluyen 1) facilitar la reepitelización después del rejuvenecimiento; 2) reducción de los síntomas de rejuvenecimiento con láser fraccionado no ablativo y ablativo (por ejemplo, eritema, edema, costra, y molestia sensorial); 3) generación de piel lisa, de textura uniforme; 4) generación de hidratación de la piel; 5) reducción de la aparición de líneas/arrugas finas; 6) aumento de la firmeza y flexibilidad de la piel; 7) reducción de alteración de la pigmentación de la piel; y 8) reducción de la piel con machas, enrojecida.

60 Las composiciones de la presente invención pueden prepararse tal como se conoce en la técnica, sin embargo emplear los métodos de cultivo innovadores que se describen en el presente documento (por ejemplo, cultivo en condiciones hipóxicas). La preparación y el uso de composiciones de MEC creadas en condiciones de cultivo de oxígeno normales para la reparación y/o regeneración de células, la mejora de las superficies de la piel, y reparación de tejido blando se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.830.708.

65

En otra realización, la presente invención incluye un agente anti-adhesión biológico que incluye las composiciones de MEC que se describen en el presente documento. El agente puede usarse en tales aplicaciones como parches anti-adhesión usados después de la creación de anastomosis intestinal o de vasos sanguíneos.

5 Las composiciones o componentes activos usados en el presente documento, se usarán generalmente en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la enfermedad particular que se está tratando. Las composiciones pueden administrarse terapéuticamente para conseguir beneficio terapéutico o profilácticamente para conseguir beneficio profiláctico. Beneficio terapéutico significa la erradicación o mejora del estado o trastorno subyacente que se está tratando. El beneficio terapéutico incluye también detener o ralentizar la progresión de la enfermedad,
10 independientemente de si se realiza una mejora.

La cantidad de la composición administrada dependerá de una variedad de factores, que incluyen, por ejemplo, el tipo de composición, la indicación particular que se está tratando, el modo de administración, ya sea profiláctico o terapéutico el beneficio deseado, la gravedad de la indicación que se está tratando y la edad y el peso del paciente,
15 y la eficacia de la forma farmacéutica. La determinación de una dosificación eficaz se encuentra claramente dentro de las capacidades de los expertos en la materia.

Dosificaciones iniciales pueden estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Las dosis iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, tales como modelos animales. Modelos animales útiles para someter a prueba la eficacia de las composiciones para potenciar el crecimiento del cabello incluyen, entre otros, roedores, primates y otros mamíferos. Los expertos en la materia pueden determinar dosificaciones adecuadas para la administración humana mediante extrapolación de los datos *in vitro* y animales.

Las cantidades de dosificación dependerán de, entre otros factores, la actividad de los medios condicionados, el modo de administración, el estado que se está tratando, y diversos factores comentados anteriormente. La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles suficientes para mantener el efecto terapéutico o profiláctico.

A continuación se presentan ejemplos que comentan la generación de composiciones de MEC contempladas para las aplicaciones comentadas. Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente las realizaciones de la presente invención, pero no están previstos para limitar el alcance de la invención. Si bien son típicos de los que podrían usarse, alternativamente pueden usarse otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidas por los expertos en la materia.

35 EJEMPLO 1

EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN COMPOSICIONES DE MEC CULTIVADAS EN CONDICIONES HIPÓXICAS

40 Se cultivaron fibroblastos de prepucio neonatales humanos primarios como monocapas convencionales en frascos de cultivo tisular y se compararon con cultivos de fibroblastos tridimensionales, dentro de una MEC de tipo fetal, depositada naturalmente. Los cultivos se hicieron crecer tal como se divulga en el presente documento. Para evaluar la expresión diferencial de genes, se completaron muestras de ARN total usando micromatrices Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays® para la expresión génica global (incluyendo menos de 40.000 genes) siguiendo el protocolo del fabricante.
45

Tras la comparación, se descubrió que los fibroblastos regulan la expresión génica de colágeno y MEC en cultivos tridimensionales dentro de una MEC secretada naturalmente cultivada hipóxica. La regulación por incremento y regulación por disminución de la expresión de diversos genes de colágeno y MEC son evidentes en la Tabla 3.

50

Tabla 3. Expresión diferencial de colágeno y MEC en cultivos de fibroblastos tridimensionales hipóxicos

GEN	AUMENTO EN VECES	DISMINUCIÓN EN VECES
COL4A1	17,2	
COL20A1	6,88	
COL19A1	5,22	
COL9A1	4,81	
COL10A1	4,45	
COL6A3	3,48	
COL9A2	2,48	

GEN	AUMENTO EN VECES	DISMINUCIÓN EN VECES
COL14A1	2	
SPARC	2,74	
COL1A2		3,45
COL13A1		4
COL18A1		4,76
COL1A2		7,14

Tras la comparación, se descubrió que los fibroblastos regulan la expresión génica de genes de la ruta de Wnt en cultivos tridimensionales dentro de una MEC secretada naturalmente cultivada hipóxica. Regulación por incremento y regulación por disminución de la expresión de diversos genes de la ruta de Wnt son evidentes en la Tabla 4.

5

Tabla 4. Expresión diferencial de Wnt en cultivos de fibroblastos tridimensionales hipóxicos

GEN	AUMENTO EN VECES	DISMINUCIÓN EN VECES
WNT4	5,94	
WNT7a	5,43	
WNT 7b	4,05	
WNT 2b	3,95	
WNT 10a	3,86	
WNT 8b	3,48	
WNT 6	3,36	
WNT 3a	3,19	
WNT 9b	3,06	
WNT 9a	3,02	
WNT 11	2,89	
WNT 5a		8,33
WNT 2		7,14
WNT 5b		5,26
LRP6	3,43	
LRP3	2,27	
LRP11		10
LRP12		7,69
DKK1		50
DKK3		5,88
FSZD5	4,48	
FRZ9	3,85	
FRZB	3,36	
FRZD1	2,94	
SFRP2	2,95	
FRZD1	2,92	
FRZD3	2,84	

GEN	AUMENTO EN VECES	DISMINUCIÓN EN VECES
AXIN2	4,4	
KREMEN2	4,24	
KREMEN1	3,45	
β-CATENINA		4,76
GSK3b		11,1
GSK3a		6,67
βFGF	50	50

5 Tras la comparación, se descubrió que los fibroblastos regulan la expresión génica de genes de la ruta de proteína morfogenética ósea (BMP) en cultivos tridimensionales dentro de una MEC secretada naturalmente cultivada hipóxica. La regulación por incremento y regulación por disminución de la expresión de diversos genes de la ruta de BMP son evidentes en la Tabla 5.

Tabla 5. Expresión diferencial de BMP en cultivos de fibroblastos tridimensionales hipóxicos

GEN	AUMENTO EN VECES	DISMINUCIÓN EN VECES
BMP7/OP1	4,88	
BMP2	4,19	
BMP5	3,49	
BMP3	3,44	
BMPreclb	3,37	
BMP8b	3,36	
BMP 8a	3,15	
BMP 10	2,86	
BMP1	2,12	
BMPrecla		2,5
Osteocalcina		2,5
Osteopontina		6,25
BMPrecll		6,25

10 Tras la comparación, se descubrió que los fibroblastos regulan la expresión de genes adicionales en cultivos tridimensionales dentro de una MEC secretada naturalmente cultivada hipóxica. Regulación por incremento y regulación por disminución de la expresión de genes adicionales son evidentes en la Tabla 6. Los resultados indican que condiciones de cultivo hipóxicas dan como resultado un aumento de 14,78 veces en la expresión de ARNm para el factor inducible por hipoxia (HIF 1A) y una disminución de 4,9 veces en su inhibidor respectivo. Esto sugiere que el medio condicionado cultivado hipóxico está experimentando un entorno de tensión de bajo contenido en oxígeno (hipoxia) porque el ARN mensajero para HIF 1A que codifica para la traducción de la proteína está regulado por incremento y su inhibidor está regulado por disminución. Además, los niveles de VEGFB (aumento de 4,33 veces), KGF (aumento de 11,51 veces), e IL-8 (aumento de 5,81 veces) también se regularon por incremento en condiciones de cultivo hipóxicas.

20 Tabla 6. Cambios en la expresión génica adicionales resultantes del cultivo de bajo contenido en oxígeno de MEC de fibroblastos *in vivo*

GENES	AUMENTO EN VECES	DISMINUCIÓN EN VECES
Colágenos		
COL5A1	6,21	

ES 2 667 265 T3

GENES	AUMENTO EN VECES	DISMINUCIÓN EN VECES
COL9A2	3,96	
COL6A2	3,78	
COL6A2	3,21	
COL11A1	3,07	
COL8A1	2,78	
COL4A5	2,45	
COL7A1	2,45	
COL18A1	2,41	
COL12A1	2,04	
COL1A2		0,5
COL14A1		0,45
COL4A1		0,45
COL5A2		0,23
COL6A1		0,16
Metaloproteinasas de matriz (MMP)		
MMP23B	2,75	
MMP27		0,24
MMP28	0,17	
MMP10		0,16
MMP1		0,16
MMP7		3,1
MMP14		0,08
MMP3		0,06
MMP12		0,05
Otra MEC		
HAPLN3	8,11	
ACAN L12234	5,48	
AGC1	3,32	
LAMA3	2,92	
LAMA1	2,14	
LAMA5	2,14	
Genes adicionales		
HIF 1A	14,18	
HIF 1AN	4,9	4,9
VEGFB	4,33	
VEGFC	3,84	
KGF	11,51	
IL-8	5,81	

Tabla 7. Expresión génica relacionada con células madre

GENES	AUMENTO EN VECES	DISMINUCIÓN EN VECES
Oct4	5,1	
Sox2	8,2	
NANOG	4,9	
KLF4	21,0	
cMyc	7,1	

EJEMPLO 2

5 PRODUCCIÓN DE MEC HIPÓXICA USANDO FIBROBLASTOS DE PREPUCIO NEONATALES HUMANOS PRIMARIOS

Se proporcionan dos ejemplos de cultivo hipóxico de MEC usando fibroblastos de prepucio neonatales humanos primarios.

10 Los fibroblastos de prepucio neonatales humanos primarios se expandieron en frascos de cultivo tisular en presencia de suero bovino fetal al 10 %, 90 % de DMEM de alto contenido en glucosa con L-glutamina 2 mM (10 % de FBS/DMEM). Se subcultivaron células usando solución de tripsina al 0,05 %/EDTA hasta el tercer pase, momento en el que se sembraron o bien en perlas de dextrano Cytodex-1 a 0,04 mg de perlas secas/ml de medio (5x10⁶ células/10 mg de perlas en un frasco de agitación de 125 ml cargado con 100-120 ml), o en malla de nailon (25x10⁶ células/6 x 100cm² de nailon). Se mantuvieron todos los cultivos en una atmósfera normal y 5 % de CO₂ para la expansión y siembra, momento en el que los cultivos de bajo contenido en oxígeno se dividieron a una cámara hermética que se inundó con el 95 % de nitrógeno/5 % de CO₂ de modo que pudo crearse un entorno hipóxico dentro del medio de cultivo. Este sistema mantiene aproximadamente un 1-5 % de oxígeno dentro del recipiente de cultivo. Las células se mezclaron adecuadamente en el volumen mínimo necesario para cubrir el nailon o las perlas para la siembra, y se mezclaron posteriormente una vez durante después de 30 minutos, entonces se dejó reposar durante la noche en un incubador humidificado a 37°C. Los cultivos se alimentaron con un 10 % de FBS/DMEM durante 2-4 semanas con un 50-70 % de intercambio de medio, cada 2-3 días mientras las células proliferaban y entonces comenzaron a depositar MEC. Los cultivos se alimentaron durante otras 4-6 semanas usando suero de ternero fetal al 10 % con suplemento de hierro, y ácido ascórbico 20 ug/ml en lugar de FBS. Los frascos de agitación se mezclaron a 15-25 rpm inicialmente y durante aproximadamente 2-4 semanas, momento en el que se aumentaron a 45 rpm y se mantuvieron a esta velocidad después de eso. Los cultivos de perlas formaron estructuras amorfas grandes que contenían MEC de tanto como 0,5 a 1,0 cm en anchura y diámetro después de 4 semanas, y estos cultivos fueron por lo tanto hipóxicos debido a la difusión de gas y altos requisitos metabólicos.

30 En un ejemplo adicional, se expandieron fibroblastos de prepucio neonatales humanos primarios en frascos monocapa, y entonces se cultivaron sobre armazones de malla de nailon para sustentar el desarrollo de un MEC *in vitro*. Los fibroblastos se expandieron en DMEM con alto contenido en glucosa, L-glutamina 2 mM, y suero bovino fetal al 10 % (v/v). Los cultivos se suplementaron también con ácido ascórbico 20 µg/ml. Después de 3 semanas en oxígeno ambiente (aproximadamente un 16 %-20 % de oxígeno), los cultivos que contenían MEC por duplicado se cambiaron a condiciones de cultivo hipóxicas (1 %-5 % de oxígeno) en una cámara sellada lavada exhaustivamente con un 95 % de nitrógeno/5 % de dióxido de carbono (n.º de cat. MC-101, Billups-Rothenberg, Inc., Del Mar, CA). Para garantizar el agotamiento del oxígeno atmosférico del medio de cultivo, 2-3 horas más tarde, la atmósfera se sustituyó para garantizar que el medio contenía aproximadamente un 1-3 % de oxígeno. Ambos conjuntos de cultivos que contenían MEC se hicieron crecer con alimentaciones dos veces a la semana durante otras 4 semanas, y entonces los cultivos se prepararon para el aislamiento de ARN. El ARN celular total se aisló usando un kit comercialmente disponible de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (n.º de cat. Z3100, Promega, Inc.). Se almacenaron muestras de ARN a -80°C, antes del procesamiento para en análisis de micromatriz de la expresión génica usando micromatrices Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays®.

45 En el análisis de los resultados, hubo aproximadamente 5.500 transcritos expresados diferencialmente detectados en sondas preparadas a partir de oxígeno ambiente en comparación con sondas a partir de cultivos de bajo contenido en oxígeno, usando las micromatrices Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays®. De estos, aproximadamente la mitad (2.500) se aumentaron más de 2,0 veces mediante el bajo contenido en oxígeno, y aproximadamente la mitad (2.500) disminuyeron más de 2,0 veces en bajo contenido en oxígeno. Esto indica que el bajo contenido en oxígeno condujo a cambios significativos en la expresión génica *in vitro*. De interés particular, los transcritos para proteínas de MEC, particularmente varios genes de colágeno se regularon por incremento, mientras que varios genes para enzimas que degradan la matriz se regularon por disminución.

EJEMPLO 3

MATRIZ EXTRACELULAR EMBRIONARIA HUMANA DISEÑADA POR INGENIERÍA GENÉTICA DE TEJIDOS PARA APLICACIONES TERAPÉUTICAS

5 La MEC embrionaria crea un entorno propicio para la proliferación celular rápida y la cicatrización sin la formación de cicatrices o adhesiones. Se hizo la hipótesis de que el crecimiento de fibroblastos neonatales humanos en 3 dimensiones en condiciones que simulan el entorno embrionario temprano previo a la angiogénesis (hipoxia y fuerzas gravitacionales reducidas) generaría una MEC con propiedades fetales. El análisis de matrices de chips de genes mostraron la expresión diferencial de más de 5000 genes en las condiciones de cultivo tisular hipóxicas frente a tradicionales. La MEC producida era similar al tejido mesenquimal fetal por que es relativamente rica en colágenos de tipo III, IV, y V, y glicoproteínas tales como fibronectina, SPARC, trombospondina, y ácido hialurónico. Puesto que la MEC desempeña también un papel regulador importante en la unión y representación de factores crecimiento en nichos putativos que sustentan las poblaciones de células madre regenerativas con factores de crecimiento clave, se evaluaron los efectos de la hipoxia sobre la expresión de factores de crecimiento durante el desarrollo de la MEC de tipo fetal en cultivo. La hipoxia puede también potenciar la expresión de factores que regulan la cicatrización de heridas y la organogénesis, tales como VEGF, FGF-7, y TGF- β , así como múltiples wnt incluyendo wnt 2b,4,7a,10a, y 11. La MEC embrionaria de ser humano estimulaba también un aumento de actividad metabólica en fibroblastos humanos *in vitro*, tal como se mide mediante una actividad enzimática aumentada usando el ensayo de MTT. Adicionalmente, se detectó un aumento en el número de células en respuesta a MEC de ser humano. Esta MEC de ser humano puede usarse como recubrimiento de superficie biológica, y tratamiento de relleno tisular en diversas aplicaciones terapéuticas donde nuevo crecimiento tisular y cicatrización sin marcas o adhesiones.

EJEMPLO 4

25 PRODUCCIÓN ACTIVIDAD DE WNT NATURALMENTE SOLUBLE PARA APLICACIONES DE MEDICINA REGENERATIVA

30 Células madre o progenitoras que pueden regenerar tejidos adultos, tales como la piel o la sangre, recapitulan el desarrollo embrionario en cierta medida para lograr esta regeneración. Un número creciente de estudios han mostrado que reguladores clave de la pluripotencia de células madre y la diferenciación específica de linaje activa durante la embriogénesis se reexpresan en el adulto en ciertas circunstancias. La familia de WNT de factores de desarrollo y crecimiento morfogenéticos secretados se encuentra entre los factores de crecimiento que pueden proporcionar potencialmente herramientas de investigación valiosas y finalmente tratamientos terapéuticos en la práctica clínica. Sin embargo, las wnt han demostrado no responder a técnicas de expresión y purificación convencionales hasta la fecha en una escala comercial, y no hay informes de producción de proteínas WNT a gran escala para permitir el desarrollo clínico de productos a base de WNT. Se han desarrollado técnicas para hacer crecer MEC de tipo fetal en cultivo usando fibroblastos dérmicos humanos neonatales en diversos armazones en cultivo para generar equivalentes de tejido tridimensional. En este proceso, se descubrió que estos cultivos pueden proporcionar una fuente a escala comercial de WNT bioactivas en el medio condicionado libre de suero usado para la producción de MEC. En este caso se presentan datos sobre este candidato de producto de WNT.

45 El análisis de expresión génica de las células demostró que se expresaron al menos 3 genes de WNT (wnt 5a, wnt 7a y wnt 11), y se expresó también un pequeño número de genes relacionados con la señalización de wnt; sin embargo, su función no se entiende completamente. Los datos de expresión génica se extendieron a un bioensayo *in vitro* para la señalización de wnt (traslocación nuclear de β -catenina en queratinocitos epidérmicos humanos primarios) y se evaluó la actividad de wnt en células madre sanguíneas. Ambos ensayos demostraron actividad coherente con la actividad de wnt canónica. Además, medios condicionados a partir de estos cultivos mostraron una actividad de wnt cuando se inyectaron en la piel de ratones, induciendo a las células madre de folículo piloso a entrar en anágena, provocando así el crecimiento del cabello. Esto indica que la actividad de WNT estabilizada dentro del medio condicionado definido y libre de suero no requirió purificación. Este producto puede usarse para la regeneración de folículo piloso y como herramienta de investigación valiosa para el cultivo de diversas células madre humanas.

55 EJEMPLO 5

FIBROBLASTOS HIPÓXICOS DEMUESTRAN UNA PRODUCCIÓN DE MEC Y EXPRESIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO ÚNICAS

60 Los fibroblastos dérmicos neonatales humanos producen una MEC cuando se cultivan *in vitro*, que imita estrechamente la dermis y que puede sustituir la dermis dañada en aplicaciones de medicina regenerativa tales como la cicatrización de heridas. Puesto que el proceso de cicatrización de heridas recapitula también el desarrollo embrionario, simulando el entorno embrionario se hace la hipótesis de que la MEC producida proporcionará una MEC potenciada para aplicaciones de regeneración tisular. Por lo tanto, se hicieron crecer MEC derivadas de fibroblastos neonatales humanos en condiciones hipóxicas en cultivo, para simular la hipoxia que existe en el

embrión temprano antes de la angiogénesis. El objetivo era generar una MEC con propiedades fetales usando condiciones hipóxicas durante el desarrollo tisular en cultivo.

La MEC producida en estos cultivos hipóxicos era similar al tejido mesenquimal fetal por que es relativamente rica en colágenos tipo III y V, y glicoproteínas tales como fibronectina, SPARC, trombospondina, y ácido hialurónico. Puesto que la MEC desempeña también un papel regulador importante en la unión y representación de factores crecimiento en nichos putativos que sustentan las poblaciones de células madre regenerativas con factores de crecimiento clave, se evaluaron los efectos de la hipoxia sobre la expresión de factores de crecimiento durante el desarrollo de la MEC de tipo fetal en cultivo. Se mostró que la hipoxia puede también potenciar la expresión de factores que regulan la cicatrización de heridas y la organogénesis, tales como VEGF, FGF-7, y TGF- β .

La MEC de ser humano estimulaba también un aumento de la actividad metabólica en fibroblastos humanos *in vitro*, tal como se mide mediante una actividad enzimática aumentada usando el ensayo de MTT. Adicionalmente, se detectó un aumento en el número de células en respuesta a MEC de ser humano. Estos resultados apoyan el uso de esta MEC de ser humano como recubrimiento/armazón en cultivos de células embrionarias y como recubrimiento/relleno de superficie biológica en diversas aplicaciones terapéuticas o dispositivos médicos.

EJEMPLO 6

MATERIALES BIOMÉDICOS RECUBIERTOS CON MATRIZ EXTRACELULAR DE SER HUMANO (MECh)

Se ha notificado que la MEC crea un entorno propicio para la proliferación celular rápida y la cicatrización sin la formación de cicatrices o adhesiones. Usando los métodos que se describen en el presente documento, se generó MEC de ser humano (MECh), de tipo embrionario, única, cultivando fibroblastos neonatales en bajo contenido en oxígeno y peso específico. Los resultados incluyeron: angiogénesis cuando MECh se coloca sobre la membrana corioalantoidea, y migración de células inflamatorias reducida cuando MECh está aplicada como recubrimiento sobre malla de nailon e implantada sobre la posición del costado en la región subcutánea de ratones SCID. Basándose en estos resultados, se hizo la hipótesis de que aplicar como recubrimiento la presente MECh sobre malla de polipropileno provocaría una migración de células inflamatorias reducida y encapsulación fibrosa en la superficie de contacto de material-material biológico en la región subcutánea de ratones SCID.

Las composiciones de MEC generadas usando materiales derivados de ser humano (MECh) se aplicaron como recubrimiento sobre malla de propileno usando un reticulador fotoactivo. La MECh se aplicó como recubrimiento sobre propileno punzonado de biopsia de 6 mm mediante mecanismo de unión covalente UV (reticulador Innovative Surface Technologies (ISurTec) TriLite™). Punzones de biopsia de 6 mm de polipropileno, recubiertos y no recubiertos con MECh, es esterilizaron utilizando E-Beam™ (BeamOne LLC E-BEAM™) u óxido de etileno (ETO) (que se describe por ETO Flagstaff Medical Center). A continuación, cada disco de polipropileno de 6 mm se dividió en dos insertos semicirculares simétricos. Finalmente, los implantes de polipropileno se colocaron bilateralmente utilizando una técnica aséptica en la posición del costado en la región subcutánea. Las muestras se explantaron en el criterio de valoración de dos y cinco semanas para la histología.

Manchas inmunofluorescentes de anti-fibronectina de malla de polipropileno recubierta con MECh mostraron que los materiales de MEC se unían a y formaban un recubrimiento uniforme sobre las fibras de la malla en comparación con la malla no recubierta. La malla recubierta con HECM es adecuada para parches implantables para aplicaciones médicas, tales como reparación de hernias y reparación del suelo pélvico. Se mostró que los materiales de MEC recubren las fibras individuales de la malla tal como se muestra a través de tinción inmunofluorescente con anticuerpos anti-fibronectina, lo que permite una increscencia celular mejorada.

La MECh se implantó sobre la membrana corioalantoidea de polluelo (CAM) y estimuló una respuesta microvascular tal como se evidencia por el crecimiento de microvasculatura nueva. Adicionalmente, la malla de nailon recubierta con MECh implantada por vía subcutánea en ratones durante cuatro semanas demostró una biocompatibilidad mejorada frente a la malla de nailon no recubierta. Específicamente, se observaron menos células inflamatorias y una cápsula fibrosa más delgada con las fibras de nailon recubiertas con MECh.

Se realizaron evaluaciones de biocompatibilidad a las dos semanas y cinco semanas después de la implantación de malla de polipropileno recubierta con MECh usando muestras teñidas con hematoxilina y eosina. Para el análisis de FBGC las muestras se codificaron a ciegas, se evaluaron usando morfometría, se separaron en grupos, se evaluaron estadísticamente, entonces de decodificaron. Se examinó el número de células gigantes de cuerpo extraño (FBGC). El número de FBGC por fibra dos semanas después de la implantación se muestra en las Figuras 1A-B así como muestras adicionales en las Figuras 14A-B. El número de células gigantes de cuerpo extraño por fibra cinco semanas después de la implantación se muestra en las Figuras 2A-B así como muestras adicionales en las Figuras 15A-B. Es evidente una reducción en las FBGC para malla de polipropileno recubierta con MECh en comparación con malla no recubierta. En el punto temporal de dos semanas, se determinó que el recuento de FBGC medio por muestra era estadísticamente más alto (análisis de ANOVA bonferroni post-hoc $p < 0,05$) para polipropileno no recubierto (9,20 \pm 2,03) frente polipropileno recubierto con MECh (4,53 \pm 0,89). En el punto temporal de cinco

semanas, se determinó que el recuento de FBGC medio por muestra era más alto, aunque no estadísticamente significativo, para polipropileno recubierto (10,95 +/-2,15) frente a polipropileno recubierto con MECh (8,17 +/-1,41).

Los resultados indicaron que polipropileno recubierto con MECh puede reducir las cápsulas fibrosas. La encapsulación fibrosa se evaluó en el punto temporal de dos y cinco semanas usando muestras teñidas con Trichrome. Para el análisis de las cápsulas las muestras se codificaron a ciegas, se evaluaron usando morfometría, se separaron en grupos, se evaluaron estadísticamente, entonces se decodificaron. En el punto temporal de dos semanas, se determinó que el espesor de cápsula fibrosa medio no era estadísticamente más alto (análisis de ANOVA bonferroni post-hoc $p < 0,05$) para polipropileno recubierto con MECh (23,70 +/-2,70 μM), frente a polipropileno no recubierto (19,70 +/-3,00 μM) (Figuras 16A-B). En el punto temporal de cinco semanas, se determinó que el espesor de cápsula fibrosa medio era de (10,40 +/-1,10 μM) para polipropileno recubierto con MECh, frente a polipropileno no recubierto (12,30 +/-1,20 μM) (Figuras 17A-B). De nuevo, se determinó que las diferencias en el polipropileno recubierto con MECh, frente a polipropileno no recubierto, no eran estadísticamente significativa. Sin embargo, se descubrió una observación importante cuando se evaluó la diferencia de porcentaje promedio en la encapsulación fibrosa de los puntos temporales de dos a cinco semanas. La disminución del porcentaje promedio en la encapsulación fibrosa de los puntos temporales de dos semanas a cinco semanas fue de un 37,6 % para polipropileno no recubierto con MECh, frente a un 56,1 % para polipropileno recubierto con MECh.

Un mecanismo de formación de FBGC es el resultado de la fusión de macrófagos en una respuesta inmunitaria a biomateriales implantables tales como polipropileno. Estas células multinucleadas grandes proporcionan un medio efectivo para evaluar de forma cuantitativa la respuesta inflamatoria a biomateriales implantables. Se observó una reducción significativa en el recuento de FBGC por muestra con polipropileno recubierto con MEC de ser humano frente a polipropileno no recubierto en el punto temporal de dos semanas. Estos datos sugieren que el recubrimiento de superficie de MEC de ser humano puede servir como aplicación para una variedad de dispositivos implantables.

Históricamente, se ha desafiado la efectividad y longevidad de los dispositivos implantables por respuestas inmunitarias específicas, incluyendo la formación de FBGC y cápsula fibrosa. Específicamente, las FBGC pueden excretar agentes degradantes tales como superóxidos y radicales libres, así como otros agentes degradantes desafían la efectividad y longevidad de los dispositivos. Estos efectos negativos son especialmente significativos, puesto que se sabe que las FBGC permanecen localizadas inmediatamente alrededor del implante durante la duración de la presencia del implante. La formación de cápsula fibrosa, que surge como una encapsulación de colágeno vascular firme alrededor de un implante, se diseña para aislar dispositivos implantables extraños del hospedador o tejido hospedador. Esta respuesta no solo puede provocar incomodidad al paciente en determinados casos, sino que puede acortar la duración de viabilidad del dispositivo e incluso disminuir la efectividad del dispositivo. Por lo tanto, un recubrimiento que reduce FBGC y la encapsulación fibrosa es un resultado altamente deseable para la longevidad y función de los dispositivos implantables.

Los hallazgos de que aplicar como recubrimiento MECh sobre polipropileno reducirán la presencia de FBGC, y la reducción potencial en la encapsulación fibrosa en la superficie de contacto de material-material biológico, apoya la necesidad de más experimentación. La evaluación futura puede incluir puntos temporales de una duración mayor para observar los cambios en el espesor de la encapsulación fibrosa con biomateriales recubiertos con MECh y no recubiertos. Adicionalmente, la evaluación con un continuo de biomateriales incluyendo dacron, nailon, acero inoxidable, y titanio en diversos entornos *in vivo*, puede aclarar resultados de biomateriales recubiertos con MECh deseables adicionales.

EJEMPLO 7

USO COMPOSICIÓN DE MATRIZ EXTRACELULAR PARA LA ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL CABELLO

Este ejemplo ilustra la estimulación del crecimiento del cabello mediante la administración de composiciones de MEC.

Las células de folículo piloso humano y las células tomadas de folículos pilosos se obtuvieron para determinar la capacidad de las composiciones de MEC que se describen en el presente documento para estimular y mantener la capacidad de formación de cabello. Las células de folículo piloso se obtuvieron de Alderans Research International. Las células se cultivaron en presencia de MEC. El análisis de las células a las cuatro semanas y ocho semanas de cultivo mostró estructuras que se asemejaban a folículos pilosos así como estructuras que se asemejaban a tallos pilosos tal como se muestra en las Figuras 3A y B. Después de dos meses de cultivo continuo, las células seguían vivas y creciendo.

Se trasplantaron en ratones células cultivadas durante cuatro semanas en presencia de composición de MEC. Cuatro semanas después del trasplante, los folículos pilosos humanos cultivados formaron muchos folículos grandes en comparación con las células control que mostraron solo números normales de folículos pilosos en reposo pequeños, tal como se observa usando análisis de imágenes de microscópico.

Basándose en estos hallazgos, se realizó un ensayo de crecimiento del cabello *in vivo* usando un sujeto humano para determinar la regeneración del cabello folicular *de novo*. El estudio reclutó 24 hombres de 18 a 45 años de edad que tenían una pérdida de cabello con patrón masculino (MPHL, por sus siglas en inglés). Todos los miembros del grupo de estudio se encontraban sin cirugía del cuero cabelludo tópica invasiva o mínimamente invasiva previa o tratamiento tópico con Minoxidil™ o Finasteride™. Se usó un láser Palomar Starluz 550p (1540 no ablativo y 2940 ablativo). La duración del estudio se diseñó hasta 12 meses para el seguimiento, nivel inicial y 5 meses (tras única inyección sc). Después de la inyección, se observó un periodo de eliminación de tres días y los sujetos solo usaron el champú Cetaphil™ a lo largo de todo el estudio. Se realizó una combinación de aplicación de láser y microdermoabrasión antes de la inyección.

Se administró a los sujetos vehículo mezclado con MECh que se determinó que tenía actividad de proteína wnt y que incluía wnt 7a transdérmicamente junto con vehículo control y solución salina. Los criterios de valoración del estudio incluían un sistema de puntuación clínica de 7 puntos (3 cirujanos de trasplante capilar ciegos), macrofotografía clínica (recuentos de folículos), biopsias de punzón de 2 mm y cuestionarios de autoevaluación del sujeto.

Se analizaron las unidades foliculares individuales para los sujetos. Los folículos se contaron a las 12 semanas y se compararon con el nivel inicial observado para el mismo individuo al comienzo del estudio. Se observaron aumentos en las unidades foliculares en sujetos a los que se había administrado MECh sin perturbación. Por ejemplo, en un sujeto, el tratamiento aumentó el número de folículos pilosos aparentes con respecto a un nivel inicial de 217 a 265 a las 12 semanas. Los recuentos capilares totales para el sujeto mostraron un aumento de 307 a 360, un aumento de aproximadamente un 20 % en total. Se observaron los siguientes aumentos en recuentos foliculares en otros sujetos, tal como sigue: sujeto 009 (recuento capilar inicial 179, recuento capilar a las 12 semanas 193, recuento capilar a las 5 semanas 201); sujeto 013 (recuento capilar inicial 266,5, recuento capilar a las 12 semanas 267, recuento capilar a las 5 semanas 294); sujeto 024 (recuento capilar inicial 335,5, recuento capilar a las 12 semanas 415, recuento capilar a las 5 semanas 433). Además, 12 de los 13 pacientes (92,3 %) a los que se había administrado MECh en el estudio, mostraron eficacia a las 12 semanas. La Figura 18 muestra mediciones del crecimiento del cabello adicionales a los 3 meses.

Resultados adicionales se muestran en las Figuras 19 y 20 que muestran características de crecimiento del cabello para 2 sujetos de prueba a las 12 y 22 semanas respectivamente.

Se analizaron parámetros del cabello adicionales a lo largo de todo el estudio. Se analizó el recuento capilar relativo a las 12 semanas y 20 semanas en comparación con el nivel inicial (0 semanas), se analizó el cabello terminal en comparación con el nivel inicial, y se analizó el espesor del cabello en comparación con el nivel inicial. Por ejemplo, en un sujeto, el tratamiento aumentó el recuento capilar, cabello terminal y espesor folicular, a las 12 semanas, 22,4 %, 27,8 % y 23,9 % respectivamente en comparación con el nivel inicial. En otro sujeto, el tratamiento aumentó el recuento capilar, cabello terminal y espesor folicular, a las 12 semanas, 23,7%, 24,2% y 22,2% respectivamente en comparación con el nivel inicial. En el sujeto 009 (que tenía un recuento capilar inicial 179, recuento capilar a las 12 semanas 193, recuento capilar a las 5 semanas 201, tal como anteriormente), el tratamiento aumentó el recuento capilar, cabello terminal y espesor folicular, a las 12 semanas, 7,8%, 48,5 % y 19,2 % respectivamente; y, a las 20 semanas, 12,9%, 33,0 % y 21,1 % respectivamente, en comparación con el nivel inicial. En el sujeto 013 (que tenía un recuento capilar inicial 266,5, recuento capilar a las 12 semanas 267, recuento capilar a las 5 semanas 294, tal como anteriormente), el tratamiento aumentó el recuento capilar, cabello terminal y espesor folicular, a las 12 semanas, 0,2%, 25,0% y 8,3% respectivamente; y, a las 20 semanas, 10,3%, 41,4% y 23,0% respectivamente en comparación con el nivel inicial. En el sujeto 024 (recuento capilar inicial 335,5, recuento capilar a las 12 semanas 415, recuento capilar a las 5 semanas 433 tal como anteriormente). El tratamiento aumentó el recuento capilar, cabello terminal y espesor folicular, a las 12 semanas, 23,7%, 24,2% y 22,2% respectivamente; y, a las 20 semanas, 29,1%, 5,9 % y 17,3 % respectivamente en comparación con el nivel inicial respectivamente.

Los resultados agregados para 13 miembros del estudio se muestran en las Figuras 21 y 22. La distribución de las respuestas de los miembros del estudio a los 3 meses se muestra en las Figuras 23-26.

Cabe destacar que los miembros del estudio tratados mostraron un aumento significativo en el número de cabellos terminales y aumento en la densidad de espesor a los 3 meses (84,6 % de pacientes). Adicionalmente, no se observaron reacciones adversas, se observó una histología normal y no se observaron hamartomas.

Los resultados señalan el uso de MECh en aplicaciones adicionales, tales como para prevenir la pérdida de cabello en pacientes después del trasplante y para el crecimiento de cejas y pestañas. En pacientes de trasplantes de cabello, es sabido que el cabello se cae y generalmente tarda de 4 a 5 meses en volver, por lo tanto, el tratamiento con MECh prevendría la pérdida de cabello en tales individuos después del trasplante.

EJEMPLO 8

GENERACIÓN DE COMPOSICIONES DE MATRIZ EXTRACELULAR DE SER HUMANO (MECh)

5 La composición de MEC de ser humano se generó usando fibroblastos humanos de recién nacido. Los fibroblastos se sembraron sobre estructuras de tipo perla condicionadas con medios líquidos. Las condiciones de cultivo se optimizaron sin necesidad de suero bovino fetal. En el plazo de pocos días, en las condiciones de cultivo embrionario que se describen en el presente documento, las células produjeron una MEC de tipo embrionario densa. Se observó la secreción de proteínas de la familia Wnt, así como varios factores de crecimiento.

10 Los cultivos se hicieron crecer hasta confluencia. Los cultivos se expusieron posteriormente a agua estéril para inducir una lisis uniforme de las células. La MECh acelular se lavó entonces para garantizar la eliminación de todas las células vivas y el residuo celular, y se examinó microscópicamente para confirmar la eliminación del residuo celular. A continuación, se expusieron fibroblastos humanos a frascos de cultivo recubiertos con la MECh o se sembraron en placa en un frasco no tratado y entonces se cubrieron una capa gruesa de matriz. Las proteínas de MEC identificadas en la MECh se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Proteínas de matriz extracelular observadas en MECh

Proteína de matriz	Función
Versicano	estructural, se une a ácido hialurónico (HA) y colágeno
Decorina	se une a factores de crecimiento, influye en la estructura de colágeno
Betaglicano	receptor de TGF-β de tipo III
Sindecán	se une a factores de crecimiento, potencia la actividad
Colágeno Tipo I, II, III, V	proteínas estructurales principales de la dermis
Fibronectina	adhesión celular, propagación, migración, motogénesis
Tenascina	inducida en la cicatrización de heridas, control de la adhesión celular

20 Se observó que la MECh inducía un aumento de la actividad metabólica de las células, tal como se mide mediante una actividad enzimática aumentada usando el ensayo de MTT tal como se muestra en la Figura 4. MEC de ser humano, a diferencia de MEC de ratón, indujo un aumento dependiente de la dosis en la actividad metabólica celular, tal como se midió mediante ensayo de MTT. Se observó que las células se infiltraron rápida y uniformemente en el material de revestimiento de MECh. Además, hubo un aumento dependiente de la dosis en el número de células en respuesta a MECh, tal como se midió mediante el ensayo Pico Green tal como se muestra en la Figura 5.

30 Recubrimientos conocidos, sustancias inyectables, y productos de matriz implantables son típicamente o bien colágenos de bovino, proteínas de matriz de porcino derivadas de los intestinos o vejiga urinaria, ácido hialurónico, o MEC de ser humano derivada de piel de cadáver. Aunque estos productos pueden ofrecer beneficios creando un entorno más fisiológicamente equivalente, ninguno es completamente humano y contiene toda la gama de proteínas de matriz halladas en tejido joven, en desarrollo. La MECh producida contiene los mismos materiales de MEC hallados en tejido joven sano. Se observó también que sustentaba la proliferación activa de células humanas así como la rápida increscencia de células. Existen varias ventajas evidentes en el uso de MECh en aplicaciones que implican un sujeto humano. Por ejemplo, MECh promueve una rápida integración en la célula hospedadora y una cicatrización mejorada (actúa como armazón normal para células hospedadoras y posterior remodelación). Adicionalmente, MECh elimina la preocupación referente a la transmisión viral de tejidos de animal no humano y tejidos de ser humano (en particular BSE de tejido de bovino y TSE de tejido de ser humano). Además, se observa un rendimiento y composición de producto uniforme para MECh en comparación con productos biológicos, en particular dermis y fascia lata de ser humano. Adicionalmente, MECh reduce la erosión de tejidos hospedadores en comparación con los implantes sintéticos.

EJEMPLO 9

MATRIZ EXTRACELULAR CONDICIONADA HIPÓXICA DERIVADA DE FIBROBLASTOS HUMANOS PARA APLICACIONES MÉDICAS ESTÉTICAS

50 Se llevó a cabo un estudio aleatorizado, doble ciego, de la administración de MECh tópica después de cirugía con láser ablativo facial. El estudio reclutó 41 sujetos entre los 40 y 60 años de edad. Todos los miembros del grupo de estudio se encontraban sin cirugía invasiva o mínimamente invasiva previa, o tratamientos anti-envejecimiento tópicos en el plazo de los 12 meses previos. El procedimiento de láser incluía un procedimiento de láser ablativo fraccionado completo, periocular, perioral y rostro completo. Se usó un láser Palomar Starluz 550p (1540 no ablativo y 2940 ablativo). A los sujetos se les administraron composiciones de MECh tópicas una vez al día (a diferentes

concentraciones) o vehículo de placebo durante 14 días. Los criterios de valoración del estudio incluían fotografía clínica (3 dermatólogos-evaluaciones ciegas), pérdida de agua transepidérmica (TEWL), biopsia de punción, y evaluación de eritema, edema, y costra.

5 La composición de MECh 10X concentración proporcionó la mayor mejoría clínica en los síntomas en comparación con el control de vehículo (las evaluaciones se llevaron a cabo "a ciegas" por dos dermatólogos cosméticos, no relacionados con ninguna realización del estudio clínico). Los resultados se muestran en las Figuras 6 (eritema), 7 (edema), y 8 (costra). La evaluación fotográfica indicaba también una reducción de la gravedad del eritema en varios pacientes en los días 3, 7 y 14.

10 Se evaluaron también los valores de pérdida de agua transepidérmica (TEWL) 3, 7, y 14 días después del tratamiento con láser para los 41 sujetos. En la Figura 9 se muestran los resultados. La composición de MECh 10X concentración proporcionó una mejora en la función de barrera del estrato córneo tal como se observó en el día 3, y día 7 en comparación con el control de vehículo. En el día 7, la composición de MECh es estadísticamente significativa a ($p < 0,05$) en comparación con el control de vehículo. Esta observación es coherente con el hecho de que había sujetos en el día 7 después del tratamiento con láser fraccionado ablativo que demostraron reepitelización.

15 Se llevó a cabo también un estudio aleatorizado, doble ciego, de la administración de MECh tópica para anti-envejecimiento (por ejemplo, reducción de arrugas). El estudio reclutó 26 sujetos entre los 40 y 65 años de edad. Todos los miembros del grupo de estudio se encontraban sin cirugía invasiva o mínimamente invasiva previa, o tratamientos anti-envejecimiento tópicos en el plazo de los 12 meses previos. A los sujetos se les administraron composiciones de MECh tópicas dos veces al día o vehículo de placebo durante 10 semanas. Los criterios de valoración del estudio incluían fotografía clínica (2 dermatólogos cosméticos-evaluaciones ciegas), corneómetro-hidratación de la superficie, cutómetro-elasticidad, biopsia de punzón, evaluación molecular (recuperación de información genética epidérmica (EGIR, por sus siglas en inglés)).

20 La evaluación fotográfica del área facial indicaba la generación de pigmentación más clara, textura de la piel más lisa, piel tonificada más uniformemente, y una reducción en la aparición de arrugas y líneas finas después de 10 semanas de la administración de MECh.

25 El análisis de imágenes de perfilometría tridimensional de réplicas de silicio del área periocular se llevó a cabo también para 22 de los 26 sujetos. Para realizar el análisis, se dirigió una fuente de luz colimada en un ángulo de 25° con respecto al plano de la réplica. La réplica se colocó en un soporte que fijaba la dirección de la posición la pestaña de la réplica de modo que la réplica podía rotarse para alinear la dirección de la pestaña perpendicular o paralela a la dirección de la luz incidente. Las réplicas se tomaron del área de las patas de gallo adyacente a cada ojo con la dirección de la pestaña apuntando hacia la oreja. La orientación de toma de muestras perpendicular proporcionó mediciones de textura sensibles a las líneas inducidas por la expresión mayores (patas de gallo). La orientación de toma de muestras paralela proporcionó mediciones de textura sensibles a las líneas finas menores. En la Figura 10 se muestran los resultados.

35 Se llevó a cabo un estudio aleatorizado, doble ciego, de la administración de MECh tópica después de cirugía con láser ablativo facial. El estudio reclutó 49 sujetos entre los 40 y 60 años de edad. Todos los miembros del grupo de estudio se encontraban sin cirugía invasiva o mínimamente invasiva previa, o tratamientos anti-envejecimiento tópicos en el plazo de los 12 meses previos. El procedimiento de láser incluía un procedimiento de láser ablativo fraccionado completo, periocular, perioral y rostro completo. Se usó un láser Palomar Starluz 550p (1540 no ablativo y 2940 ablativo). A los sujetos se les administraron composiciones de MECh tópicas dos veces al día o vehículo de placebo durante 14 días. Los criterios de valoración del estudio incluían fotografía clínica (3 dermatólogos-evaluaciones ciegas), mexámetro y evaluación del sujeto.

40 La evaluación fotográfica del área facial en los días 1, 3, 5, 7 y 14 después de la cirugía mostró una clara reducción en el eritema en cada punto temporal en comparación con placebo.

45 Los días de uso de petrolato se evaluaron después de la cirugía tal como se muestra en la Figura 11. La clasificación del eritema se llevó a cabo tal como se muestra en la Figura 12. Los resultados del mexámetro se muestran en la Figura 13 para los ajustes de láser tanto ablativo (2940) como no ablativo (1540).

50 Los resultados de los estudios indicaron varias características beneficiosas de composiciones tópicas que contienen MECh. Tales beneficios incluían 1) facilitar la reepitelización después del rejuvenecimiento; 2) reducción de los síntomas de rejuvenecimiento con láser fraccionado no ablativo y ablativo (por ejemplo, eritema, edema, costra, y molestia sensorial); 3) generación de piel lisa, de textura uniforme; 4) generación de hidratación de la piel; 5) reducción de la aparición de líneas/arrugas finas; 6) aumento de la firmeza y flexibilidad de la piel; 7) reducción de alteración de la pigmentación de la piel; y 8) reducción de la piel con machas, enrojecida.

55

EJEMPLO 10

USO COMPOSICIONES DE MATRIZ EXTRACELULAR PARA LA ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO DEL CABELLO

5 Este ejemplo ilustra la estimulación del crecimiento del cabello mediante la administración de composiciones de MEC.

10 Después de los estudios preclínicos de seguridad y eficacia que indicaron propiedades tóxicas mínimas y sugirieron que la inducción de anágena en folículos en telógena en un modelo de murino de crecimiento del cabello podría acelerarse mediante inyección de MEC, se realizó un estudio piloto para evaluar la actividad de la preparación en el hombre. El estudio clínico era un ensayo clínico de sitio único aleatorizado, controlado por placebo, doble ciego, llevado a cabo en San Pedro Sula, Honduras y se diseñó en principio para evaluar la seguridad en la aplicación clínica del producto de MEC. El objetivo secundario del estudio fue evaluar la actividad clínica del producto o "prueba de concepto". También como parte del estudio, se evaluó si la perturbación/estimulación en el cuero cabelludo antes de la inyección de MEC tendría algún efecto aditivo sobre el crecimiento del cabello. Se seleccionaron tres dispositivos de perturbación diferentes: 1) micro-dermoabrasión (MegaPeel™, DermaMed Intl, Inc., Lenni, PA); 2) pases solapantes de láser de erbio no ablativo 1540 y ablativo 2940 (Palomar Medical Technologies, Inc., Burlington, MA); y, 3) estimulación con terapia de bajo nivel de luz mediante Revage670™ (Apira Science Inc., Newport Beach, CA). Los participantes del estudio seleccionados se asignaron al azar a uno de estos tres métodos de perturbación. Se evaluaron dos preparaciones de MEC en el estudio; una preparación libre de suero, concentrada 10x, y una segunda preparación, no concentrada, que contiene suero bovino. La presencia de proteínas Wnt en la MEC usada en estos estudios se evaluó mediante análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo primario que reconoce la proteína Wnt7a (Santa Cruz Biologicals, CA). La bioactividad de Wnt canónica de MEC se confirmó demostrando la traslocación nuclear de β -catenina en queratinocitos epidérmicos humanos *in vitro*. Se usó LiCl como control positivo (datos no mostrados), y el tratamiento con vehículo o MEC en presencia del antagonista de receptor de Wnt DKK-1 no produjo traslocación de β -catenina. La solución de MEC contenía también VEGF y KGF, tal como se determina mediante ELISA.

30 Tras obtener el consentimiento informado, se reclutaron 26 sujetos sanos entre 18-55 años de edad. Los criterios de inclusión incluían una puntuación de Fitzpatrick de I-IV, clasificación de Norwood/Hamilton para la pérdida de cabello de patrón masculino 4 - 6, y ninguna historia de tratamientos capilares previos o compromiso inmunológico. Se identificaron cuatro zonas como sitios de tratamiento en el cuero cabelludo de cada sujeto, dos anteriores y dos posteriores. Cada sitio de tratamiento se marcó con un tatuaje en su periferia. Los dos sitios anteriores se aleatorizaron y se inyectaron con una de las dos preparaciones de MEC o placebo (condicionado no condicionado) sin perturbación previa a la inyección. Los sitios de tratamiento posteriores se perturbaron usando uno de los 3 tratamientos antes mencionados inmediatamente mediante inyección con MEC o placebo, también aleatorizados derecha/izquierda. En todos los pacientes, cada sitio recibió cuatro inyecciones de 0,1 cc colocadas de manera intradérmica en el día cero.

40 Una combinación de evaluaciones globales de investigador, recuentos capilares a través de macrofotografía, y autoevaluaciones del sujeto de prueba se realizaron en el tiempo cero, semana 12 y semana 22. En 6 pacientes, se realizaron biopsias de punción (4 mm) en el nivel inicial y 48 horas después de la visita de la semana 22 y se usaron para la evaluación histopatológica. Se midieron también los resultados de seguridad a través de examen visual por el médico en cada punto temporal para detectar inflamación, enrojecimiento, edema, picor, quemazón, hinchazón y cualquier otro acontecimiento adverso. Se revisó la fotografía global y macrofotografía por dermatólogos independientes para detectar cualquier acontecimiento adverso observable incluyendo enrojecimiento, hinchazón y pelos encarnados. Los efectos biológicos y clínicos del tratamiento se evaluaron a través de adquisición de imágenes macrofotográficas TrichoScan y análisis para las relaciones anágena:telógena, diámetro del cabello, densidad capilar, espesor capilar, y recuentos capilares vellosos y no vellosos. Los investigadores utilizaron un sistema de calificación para determinar la mejora visual en el crecimiento del cabello regional.

50 El objetivo principal del estudio era evaluar la seguridad clínica de la administración de MEC en sujetos humanos. Todos los pacientes toleraron bien los procedimientos y no se notificaron en ninguno de los sujetos quejas significativas, síntomas clínicos o signos de una reacción adversa. La evaluación histopatológica de las biopsias del sitio de tratamiento tomadas a las 22 semanas después del tratamiento reveló una inflamación de mínima a ligera en el sitio de inyección, y no se observaron morfologías anómalas, hamartomas u otras respuestas patológicas. A partir de estas observaciones, se concluye que una única inyección intradérmica MEC no dio como resultado ninguna toxicidad, patología u otro acontecimiento adverso significativos durante el transcurso del estudio.

60 Un objetivo secundario de evaluar el efecto clínico de MEC sobre el crecimiento del cabello se consiguió mediante análisis de imágenes Trichoscan. Los resultados se expresan como medias de grupo \pm SEM a menos que se indique lo contrario. La equivalencia de sitios de tratamiento en el día cero antes de la manipulación se determinó usando ANOVA de una vía. Diferencias posteriores entre las medias de grupo dentro de un grupo de tratamiento en el día 0, 12 y 22 semanas después del tratamiento se evaluaron usando pruebas de la t de Student de dos colas, pareadas (mediciones repetidas). Todas las otras diferencias entre medias de grupo se evaluaron usando la prueba de la t de

Student de dos colas, desapareada. La significación estadística se fijó a un nivel de $\alpha = 0,05$. Una comparación del día 0, medias de grupo de pretratamiento de las mediciones de indicador de crecimiento del cabello entre los sitios no tratados y tratados designados, no indicó diferencias estadísticamente significativas. Cualquier diferencia posterior en el crecimiento a las 12 o 22 semanas después de la administración, podría por lo tanto inferirse como un resultado del tratamiento experimental.

El análisis de imágenes de Trichoscan de sitios tratados con placebo ($n= 12$) a las 12 y 22 semanas no mostró mejoras significativas en ninguno de los indicadores de crecimiento del cabello medidos. Además, no se observaron efectos significativos con la preparación de MECh que contiene suero. Sin embargo, a lo largo del periodo de evaluación inicial de 12 semanas, la concentración más alta, sitios tratados con formulación de MECh libre de suero ($n=13$) demostraron un aumento en todos los indicadores de crecimiento del cabello con la excepción de la densidad de pelo veloso, que permanecía inalterada a lo largo del transcurso del estudio (Figuras 1D, E). La perturbación antes de la administración de MECh no dio como resultado una mejora en el crecimiento con respecto a la de administración de MECh libre de suero sola. A las 12 semanas, se observó un aumento estadísticamente significativo con respecto a los valores del día 0 en el espesor de los tallos pilosos ($p < 0,05$), densidad de espesor capilar ($p < 0,05$) y el número de cabellos terminales, no velosos ($p < 0,005$) en los sitios tratados con MECh (Figura 27). Las mejoras provocadas por el tratamiento de MECh fueron significativamente mayores que las observadas en los sitios tratados con placebo, espesor de los tallos pilosos ($6,3 \% \pm 2,5 \%$ frente a $-0,63 \% \pm 2,1 \%$; $p < 0,05$), densidad de espesor ($12,8 \% \pm 4,5 \%$ frente a $-0,2 \% \pm 2,9 \%$; $p < 0,05$), y densidad de cabello terminal ($20,6 \pm 4,9 \%$ frente a $4,4 \pm 4,9 \%$; $p < 0,05$). Un sujeto mostró un aumento del 22,4 % en el recuento capilar total y un aumento del 27,8 % en los cabellos terminales a los tres meses después de una única inyección de MECh. Aunque se observó una tendencia similar a las 22 semanas, se perdió la relevancia ya que no hubo ninguna mejora en el crecimiento adicional en los sujetos. Estos resultados demuestran claramente que una única administración de MECh intradérmica mejoró significativamente el crecimiento del cabello en sujetos con alopecia androgenética.

Este primer estudio clínico en el hombre demuestra la seguridad de la preparación de proteína de MECh secretada por fibroblastos e indica una eficacia inicial en la restauración del cabello. Las proteínas de MECh producidas por los fibroblastos que han crecido en condiciones hipóxicas incluyen factores que son importantes en la regulación del ciclo del cabello. En términos del linaje celular, los fibroblastos son las células originales de las células de la papila capilar. En estudios *in vitro* se ha determinado la presencia de proteínas Wnt, VEGF, FGF, KGF y también folistatina. Se demuestra que el papel de las proteínas Wnt es importante en el folículo piloso, desempeñando un papel crucial en el inicio del crecimiento del cabello. Además, la actividad de Wnt es importante en el ciclo del cabello, iniciando en las últimas fases de telógena la activación de células y expresión génica requerida para la formación de un germen piloso a partir de queratinocitos que comenzarán la siguiente fase anágena de crecimiento del cabello. Por lo tanto, se espera que la estimulación de recrecimiento del cabello inducida por la administración de MECh se deba, al menos en parte, a la actividad de Wnt.

Los resultados de eficacia observados con una única inyección de MECh representan un enfoque novedoso en el tratamiento de crecimiento del cabello. Los productos aprobados por la FDA, minoxidil (*por ejemplo*, Rogaine™) y finasterida (*por ejemplo*, Propecia™), requieren el uso diario del agente terapéutico para inducir y mantener su eficacia. Específicamente, estos productos muestran su mayor eficacia en la reducción de la pérdida de cabello, con un pequeño porcentaje de nuevo crecimiento del cabello observado después de al menos cuatro meses de uso diario. Por el contrario, una única inyección de MECh dio como resultado un crecimiento estadísticamente significativo de nuevos cabellos terminales y un aumento en la densidad y espesor capilar. El/las mecanismo(s) responsables del crecimiento del cabello se han estudiado durante más de una década, a medida que los investigadores han demostrado la importancia subyacente de las proteínas Wnt y factores de crecimiento de heridas en la estimulación de células madre asociadas a la papila dérmica. Este estudio clínico piloto es la primera demostración de que una preparación que contiene proteínas Wnt y factores de crecimiento de heridas tiene un efecto estimulador biológicamente activo sobre la inducción de nuevo cabello en los seres humanos.

EJEMPLO 11

FABRICACIÓN DE PRÓTESIS DE POLI(TEREFTALATO DE ETILENO) FLEXIBLE RECUBIERTA CON MEC EMBRIONARIA

Los injertos vasculares sintéticos clínicamente disponibles actuales tales como poli(tereftalato de etileno) (PET) fallan con frecuencia cuando se usan para una sustitución vascular de diámetro pequeño, debido a trombosis e hiperplasia de la íntima. El fallo se atribuye a la falta de una monocapa endotelial confluyente y una desigualdad en la flexibilidad entre el injerto vascular y el tejido circundante. Se fabricó una estructura de fibra de PET no tejida de diámetro pequeño (1,5 mm) biomecánicamente flexible, incluyendo matriz extracelular de ser humano (MECh) desarrollada en condiciones embrionarias e incluyendo proteínas que imitan las propiedades de MEC de vasos sanguíneos naturales. Las proteínas de MECh se aplicaron como recubrimiento sobre la estructura de fibra de PET no tejida a través de métodos de recubrimiento por inmersión y de injerto de amino de superficie covalente de poli(vinil amina) (PVA), para tratar las causas primarias de fallo de injerto. Las proteínas de MECh no estaban reticuladas con PET permitiendo la exposición superficial de RGD y CS5 como dominios de unión celular para células endoteliales. Trabajos previos han mostrado que polímeros de polipropileno recubiertos por inmersión con

MECh bajaron la reacción inflamatoria cuando se implantan en ratas. Además, en estudios previos se optimizaron el diámetro y tamaño de poro de armazón de fibra de PET no tejido para el crecimiento de células endoteliales (EC) y de músculo liso (SMC), fenotipo, y retención en condiciones de tensión de cizallamiento así como el comportamiento mecánico de las estructuras de fibras de PET no tejidas imitando una aorta de diámetro pequeño. Este estudio examina la unión del recubrimiento de MECh, la dosificación y uniformidad sobre los armazones de PET.

Se utilizaron los siguientes métodos. Neat PET (Dupont, Wilmington, DE), se usó para producir fibras de PET no tejidas usando el proceso de soplado en fundido con un diámetro de fibra promedio de 50 μm , y se usó la yuxtaposición de capas de fibras de PET individuales ($0^\circ/90^\circ$) para fabricar la estructura 3D. La MECh se preparó en condiciones embrionarias MECh cultivando fibroblastos dérmicos neonatales sobre microesferas de dextrano en un biorreactor con agitación durante ocho semanas. Las primeras cuatro semanas en suero de ternero bovino al 10 % que contiene medio entonces se retira a una formulación de medio libre de suero. La adición de MECh sobre los armazones vasculares de PET no tejido se realizó mediante modificación con amino de las fibras de PET mediante: NaOH 0,1 M, KCl 0,1 M, PVA-HCl 750 mM (Polysciences, EE.UU.), 400 μl de 1,4-dioxona; seguido de sonicación, y 24 h de tratamiento térmico. Los reactivos se adquirieron de Sigma Aldrich, Canadá a menos que se indique lo contrario. Las estructuras de fibras de PET no tejido (aminadas y no tratadas) se sumergieron entonces en MECh (diluida a 0,1 mg/ml a 0,6 mg/ml en PBS) durante la noche a 4 $^\circ\text{C}$. Para reducir la unión no covalente, las muestras se lavaron 3X en PBS con ciclos de sonicación de 10 min. La cobertura de MECh de las estructuras de fibras de PET no tejido se caracterizó químicamente mediante: 1) espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), 2) microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectros de energía dispersiva (EDX) para identificación química localizada, 3) hidrofilia mediante el método de caída de agua (Video Contact Angle 2000) y 4) espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). El recubrimiento de MECh se visualizó también mediante isotiocianato de rodamina B de unión fluorescente (RBITC) a MECh en un microscopio confocal (LSCM, Leica, Alemania). La dosificación del recubrimiento de MECh se cuantificó mediante tripsinización del recubrimiento de MECh y cuantificación a través de microensayo de proteína de BCA (Pierce Chemical Co, IL).

El estudio de FTIR demostró la aparición de tres picos principales que surgen de la concentración creciente del recubrimiento de MECh sobre las fibras de PET no tejidas aminadas: las bandas de 1522 cm^{-1} (amida II sN-H y mC-N), 1656 cm^{-1} (amida 1, sC=O) y 3320 cm^{-1} (sNH) (Figura 28). Los resultados de FTIR sugieren que la máxima cobertura con MECh de las fibras de PET aminadas sucede con la solución de MECh 0,6 mg/ml. Se observó la tendencia opuesta con fibras de PET no aminadas cuando los picos de MECh pequeños solo aparecían a concentraciones de MECh bajas (0,1 mg/ml a 0,2 mg/ml).

Las microfotografías de fluorescencia de SEM y RBITC demostraron una cobertura con MECh homogénea (MECh se observa claramente sobre la superficie de PET), con la concentración de MECh más alta (0,6 mg/ml) sobre las fibras de PET aminadas, que soportan la tendencia de FTIR. Por otro lado, las concentraciones de MECh bajas (hasta 0,2 mg/ml) se adherían del mejor modo sobre fibras de PET no tratadas, tal como se observa con FTIR. El microensayo de BSA reveló una retención de MECh al menos 2 veces más alta sobre fibras de PET aminadas en comparación con las fibras de PET no tratadas (0,1 mg/cm² y 0,04 mg/cm² respectivamente). Finalmente, el ángulo de contacto de PET (75 $^\circ$), disminuyó con la aminación de PET (45 $^\circ$) disminuyendo adicionalmente hasta 32 $^\circ$ con la inmovilización de MECh 0,6 mg/ml.

El recubrimiento de MECh sobre estructuras de fibras de PET vasculares no tejidas aminadas de PVA demostraron un método de recubrimiento con MECh de alta densidad sin reticulación de los dominios de MECh de unión celular con la estructura de PET.

EJEMPLO 12

MEC EMBRIONARIA APLICADA COMO RECUBRIMIENTO SOBRE INJERTOS VASCULARES DE DIÁMETRO PEQUEÑO

La retención de células endoteliales aórticas humanas (HAoEC) sobre armazones vasculares de PET no recubiertos y recubiertos con MECh se evaluó después de la exposición a tensión de cizallamiento de flujo pulsátil en un circuito de flujo que reproduce la arteria femoral y las formas de onda y pulsatilidad del flujo venoso.

Los armazones de fibras de PET no tejidas se produjeron mediante el proceso de soplado en fundido. La funcionalización de fibras de PET con MECh se realizó usando poli(vinil amina). Se sembraron HAoEC ($2,0 \times 10^5/\text{cm}^2$) sobre armazones vasculares de PET tanto no recubiertos como recubiertos con MECh y se incubaron conjuntamente estáticamente durante 3 días antes de transferirse a un reómetro vascular que simula la forma de onda del flujo pulsátil fisiológico en condiciones de flujo arterial (tasa de cizallamiento de 300 s⁻¹) y venoso (tasa de cizallamiento de 100 s⁻¹). Después de la incubación, la retención celular se caracterizó mediante observaciones de SEM, ensayo de viabilidad de azul Alamar y visualización de HAoEC fluorescente a través de marcaje con Alexa Fluor 488 (F-actina).

Se observó una reducción sustancial en la pérdida celular en los armazones vasculares de PET recubiertos con MECh en comparación con los armazones vasculares de PET no recubiertos, siguiendo condiciones de tensión de

cizallamiento tanto arteriales como venosas. El número de células retenido sobre el armazón vascular de PET recubierto con MECh era 3X más alto (tasa de retención ~85 %) que en los no recubiertos después de 1 h de flujo a las tasas arteriales. Se observaron resultados similares de retención de HAoEC significativamente más alto sobre los injertos recubiertos con MECh después de 1 h de flujo a las tasas arteriales. Esta tendencia de retención celular más alta sobre armazones vasculares de PET recubiertos con MECh después de las condiciones de tensión de cizallamiento arteriales y venosas, se confirmó también por el aumento de 3 veces tanto en la actividad metabólica (medida mediante ensayo de viabilidad celular de azul Alamar) y número de células (contado en microfotografías de SEM) obtenido en estos armazones.

La funcionalización de injertos de diámetro pequeño de PET (1,5 mm) con un método de recubrimiento con MECh de alta densidad sin reticular los dominios de unión de RGD potenció eficazmente la resistencia de HAoEC a fuerzas de cizallamiento *in vitro* simuladas fisiológicamente.

EJEMPLO 13

RECUBRIR POLÍMEROS CON MECh MEJORA SIGNIFICATIVAMENTE LA BIOCOMPATIBILIDAD

MEC de ser humano generada en condiciones embrionarias se usó para aplicar como recubrimiento en armazones poliméricos y se sometió a prueba *in vivo* o biocompatibilidad. La MECh se generó mediante fibroblastos dérmicos neonatales que se hicieron crecer en microesferas de dextrano que crecieron en un biorreactor con agitación. Armazones no tejidos de nailon, polipropileno (PPE), y poli(tereftalato de etileno) (PET) se recubrieron con MEC. El MECh se acopló con los armazones poliméricos usando: Glutaraldehyde, "dip & dry", UVA, ataque con ácido acético, poli(vinil amina) (PVA) y Sulfo Sanphah. Los diversos recubrimientos de MECh se caracterizaron usando: espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR) y de energía dispersiva (EDX) y se visualizaron usando microscopía electrónica de barrido (SEM) e inmunofluorescencia. Los mejores armazones cubiertos con MEC y no recubiertos se implantaron entonces quirúrgicamente en el espacio subcutáneo de ratones SCID. Las muestras histológicas de los implantes extirpados se evaluaron para detectar la respuesta inflamatoria, infiltración celular, formación de células gigantes de cuerpo extraño y formación de cápsula.

Los resultados de FTIR sugieren la cobertura con MEC más alta a través de las técnicas de PVA y UVA de la solución de MEC de 0,6 mg/ml. La alta densidad de la solución de MEC sugiere una cobertura polimérica completa con MEC a través de los grupos amina activados de superficie polimérica. Se deseaba una cobertura completa con MEC para "esconder" el polímero del entorno fisiológico. La tendencia se confirmó mediante micrografías de SEM y fluorescencia donde se observó una cobertura con MEC homogénea y densa.

Las células endoteliales aórticas humanas (HAoEC) sembradas en armazones recubiertos con MEC y no recubiertos se sometieron a ensayo para determinar la proliferación celular con el ensayo de azul Alamar. Típicamente, los materiales que demostraron la cobertura con MEC más alta (bajo FTIR y SEM) se unían también a las células más eficazmente y soportaban un aumento de dos veces en la proliferación celular.

Por último, los recubiertos con MEC implantados por vía subcutánea (armazones poliméricos de PET, PPE y nailon) demostraron una reducción significativa en la infiltración de células inmunitarias y formación de células gigantes de cuerpo extraño en comparación con los armazones no recubiertos. Adicionalmente, se observó formación de cápsula de colágeno e integración de tejido mejoradas con los diversos polímeros recubiertos con MEC en comparación con sus controles no recubiertos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una o más proteínas embrionarias producidas mediante un método que comprende:
- 5 cultivar fibroblastos en condiciones hipóxicas durante al menos 2 semanas en un medio de crecimiento adecuado sobre un soporte, en donde el soporte es malla o perlas, que contiene FGF básico (bFGF), bajo un 1-5 % de oxígeno, produciendo de ese modo células madre pluripotentes, en donde las células madre producen y secretan al medio y en el cultivo celular o superficies, una fracción soluble y una fracción no soluble que comprende una o
- 10 más proteínas embrionarias para su uso en medicina para estimular el crecimiento del cabello.
2. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el medio de crecimiento comprende suero, o en donde el medio de crecimiento está libre de suero.
- 15 3. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde las especies de colágeno se regulan por incremento en comparación con medios producidos en condiciones de oxígeno de aproximadamente un 15-20 % de oxígeno.
- 20 4. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el colágeno se selecciona de tipo V alfa 1; IX alfa 1; IX alfa 2; VI alfa 2; VIII alfa 1; IV alfa 5; VII alfa 1; XVIII alfa 1; o XII alfa 1.
5. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde las especies de laminina se regulan por incremento en comparación con medios producidos en condiciones de oxígeno de aproximadamente un
- 25 15-20 % de oxígeno.
6. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la especie de laminina es laminina 8.
7. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el sobrenadante libre de células se dializa, liofiliza y reconstituye en un tampón o en donde el sobrenadante libre de células se dializa, deseca y reconstituye en un tampón.
- 30 8. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde los fibroblastos son fibroblastos neonatales.
- 35 9. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde las células son específicas de la especie.
- 40 10. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde una célula de folículo piloso se pone en contacto con dicha composición.
11. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde las especies de VEGF se regulan por incremento en comparación con medios producidos en condiciones de oxígeno de aproximadamente un
- 45 15-20 % de oxígeno.
12. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la especie de VEGF es VEGF-A o una isoforma del mismo.
- 50 13. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde el medio de crecimiento está libre de suero.
14. La composición para su uso tal como se reivindica en la reivindicación 1, en donde las células madre se producen a partir de fibroblasto después de cultivar en condiciones hipóxicas, mediante lo cual las células expresan genes característicos de células madre a un nivel al menos 3 veces mayor que en condiciones normóxicas, en donde los genes se seleccionan del grupo que consiste en Oct4, Sox2, KLF4, NANOG y cMyc.
- 55 15. Un método cosmético de estimular/promover el crecimiento del cabello que comprende poner en contacto una célula con una composición obtenida mediante un método que comprende:
- 60 cultivar fibroblastos en condiciones hipóxicas durante al menos 2 semanas en un medio de crecimiento adecuado sobre un soporte, en donde el soporte es malla o perlas, que contiene FGF básico (bFGF), bajo un 1-5 % de oxígeno, produciendo de ese modo células madre pluripotentes, en donde las células madre producen y secretan al medio y en el cultivo celular o superficies, una fracción soluble y una fracción no soluble que comprende una o
- 65 más proteínas embrionarias.

16. El método de la reivindicación 15, en donde la célula es una célula de folículo piloso.
17. El método de la reivindicación 15, en donde el medio de crecimiento comprende suero, o en donde el medio de crecimiento está libre de suero.
- 5 18. El método de la reivindicación 15, en donde las especies de colágeno se regulan por incremento en comparación con medios producidos en condiciones de oxígeno de aproximadamente un 15-20 % de oxígeno.
- 10 19. El método de la reivindicación 15, en donde el colágeno se selecciona de tipo V alfa 1; IX alfa 1; IX alfa 2; VI alfa 2; VIII alfa 1; IV alfa 5; VII alfa 1; XVIII alfa 1; o XII alfa 1.
20. El método de la reivindicación 15, en donde las especies de laminina se regulan por incremento en comparación con medios producidos en condiciones de oxígeno de aproximadamente un 15-20 % de oxígeno.
- 15 21. El método de la reivindicación 15, en donde la especie de laminina es laminina 8.
22. El método de la reivindicación 15, en donde el sobrenadante libre de células se dializa, liofiliza y reconstituye en un tampón o en donde el sobrenadante libre de células se dializa, deseca y reconstituye en un tampón.
- 20 23. El método de la reivindicación 15, en donde los fibroblastos son fibroblastos neonatales.
24. El método de la reivindicación 15, en donde las células son específicas de la especie.
- 25 25. El método de la reivindicación 15, en donde las especies de VEGF se regulan por incremento en comparación con medios producidos en condiciones de oxígeno de aproximadamente un 15-20 % de oxígeno.
26. El método de la reivindicación 15, en donde la especie de VEGF es VEGF-A o una isoforma del mismo.
27. El método de la reivindicación 15, en donde el medio de crecimiento está libre de suero.
- 30 28. El método de la reivindicación 15, en donde las células madre se producen a partir de fibroblasto después del cultivo en condiciones hipóxicas, mediante lo cual las células expresan genes característicos de células madre a un nivel al menos 3 veces mayor que en condiciones normóxicas, en donde los genes se seleccionan del grupo que consiste en Oct4, Sox2, KLF4, NANOG y cMyc.
- 35

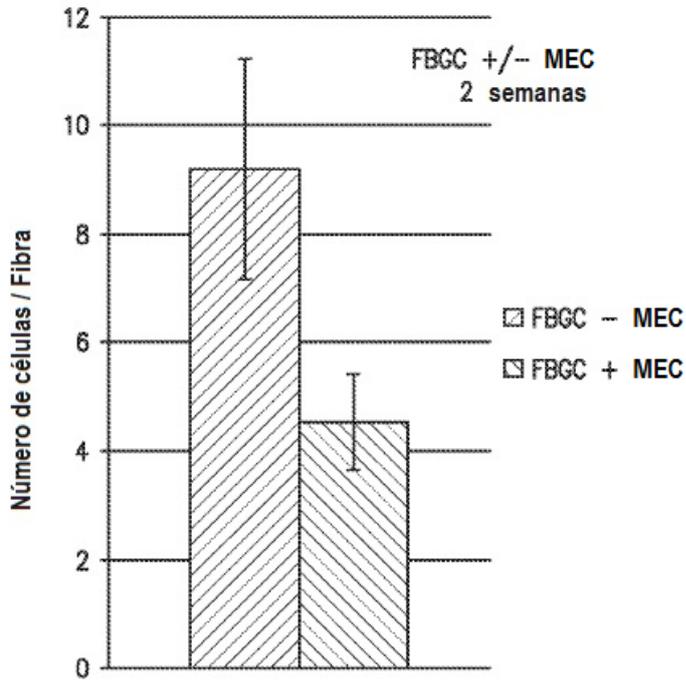


FIG. 1A

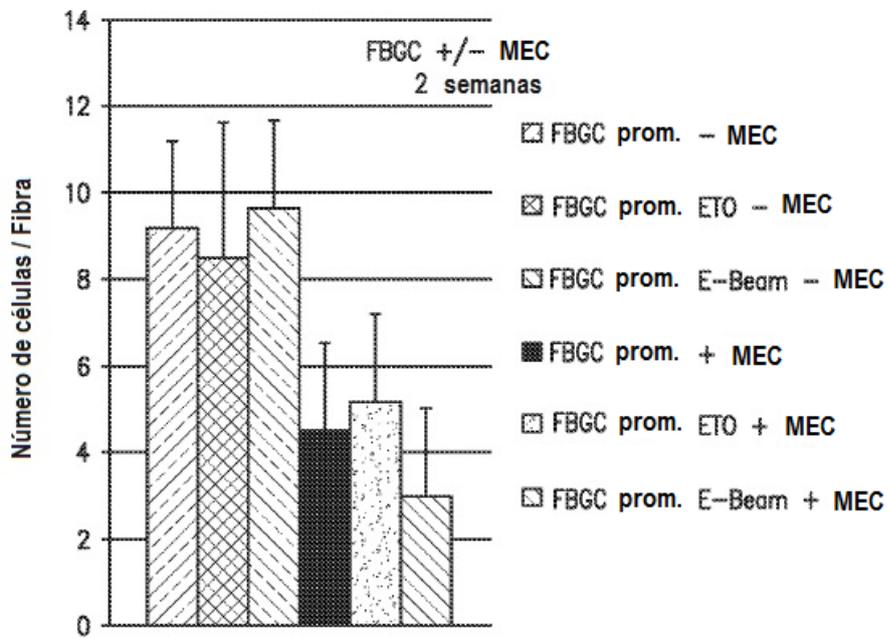


FIG. 1B

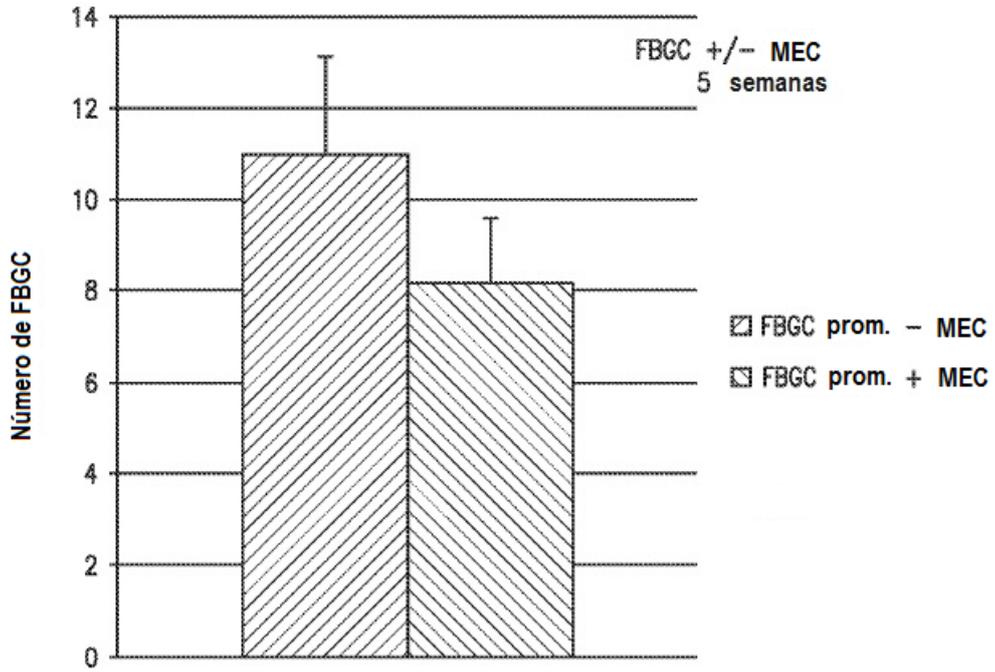


FIG. 2A

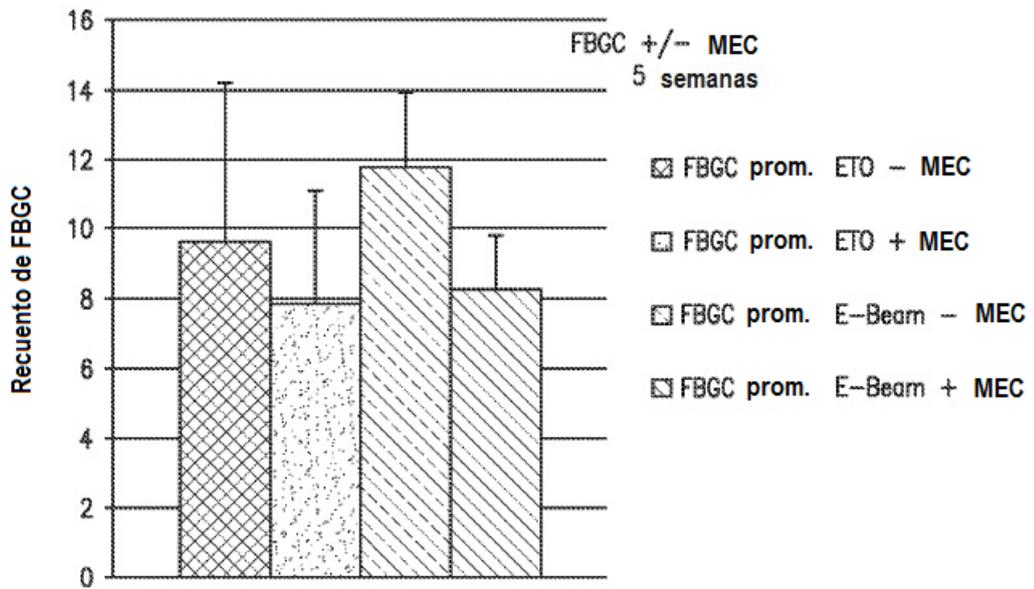


FIG. 2B



FIG. 3A

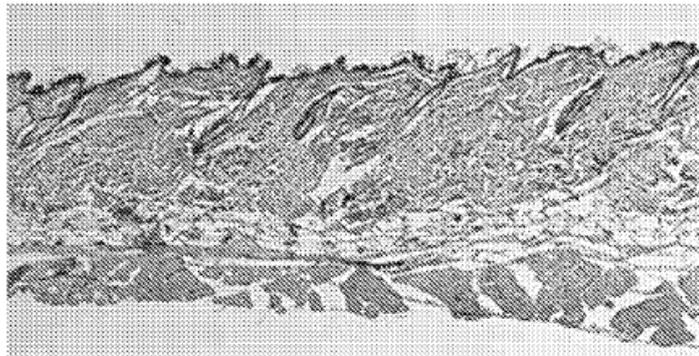


FIG. 3B

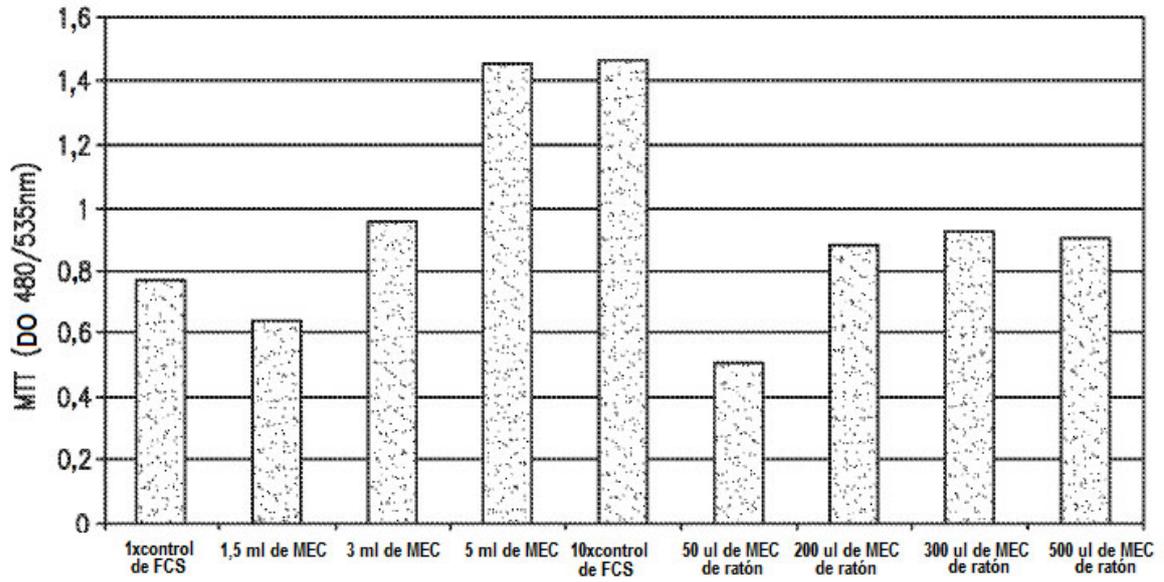


FIG. 4

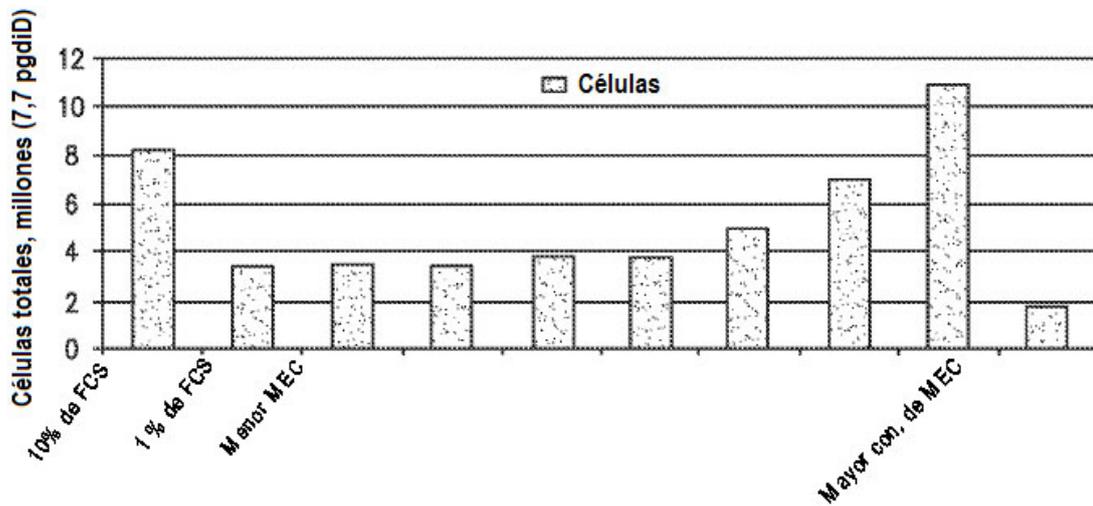


FIG. 5

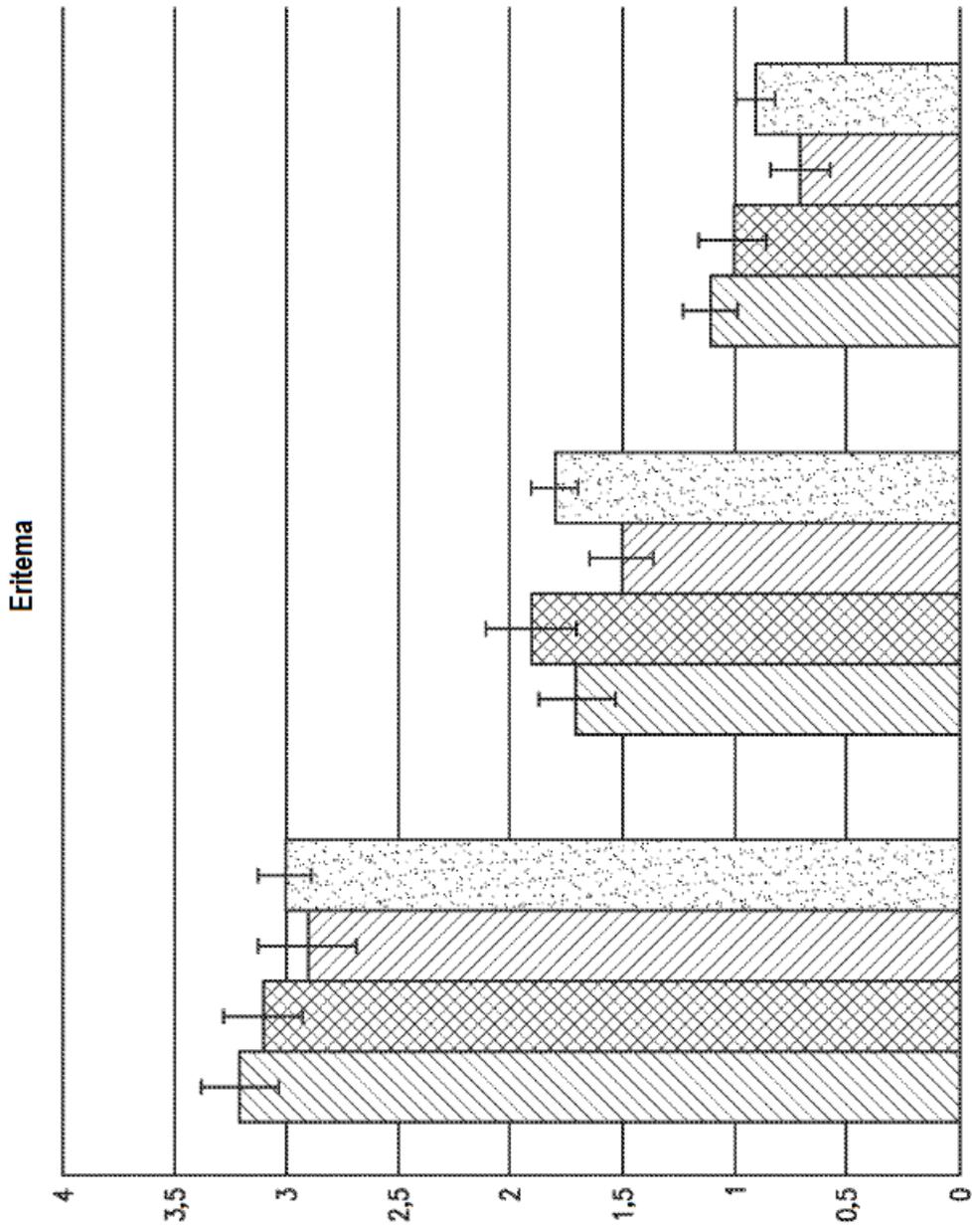


FIG. 6

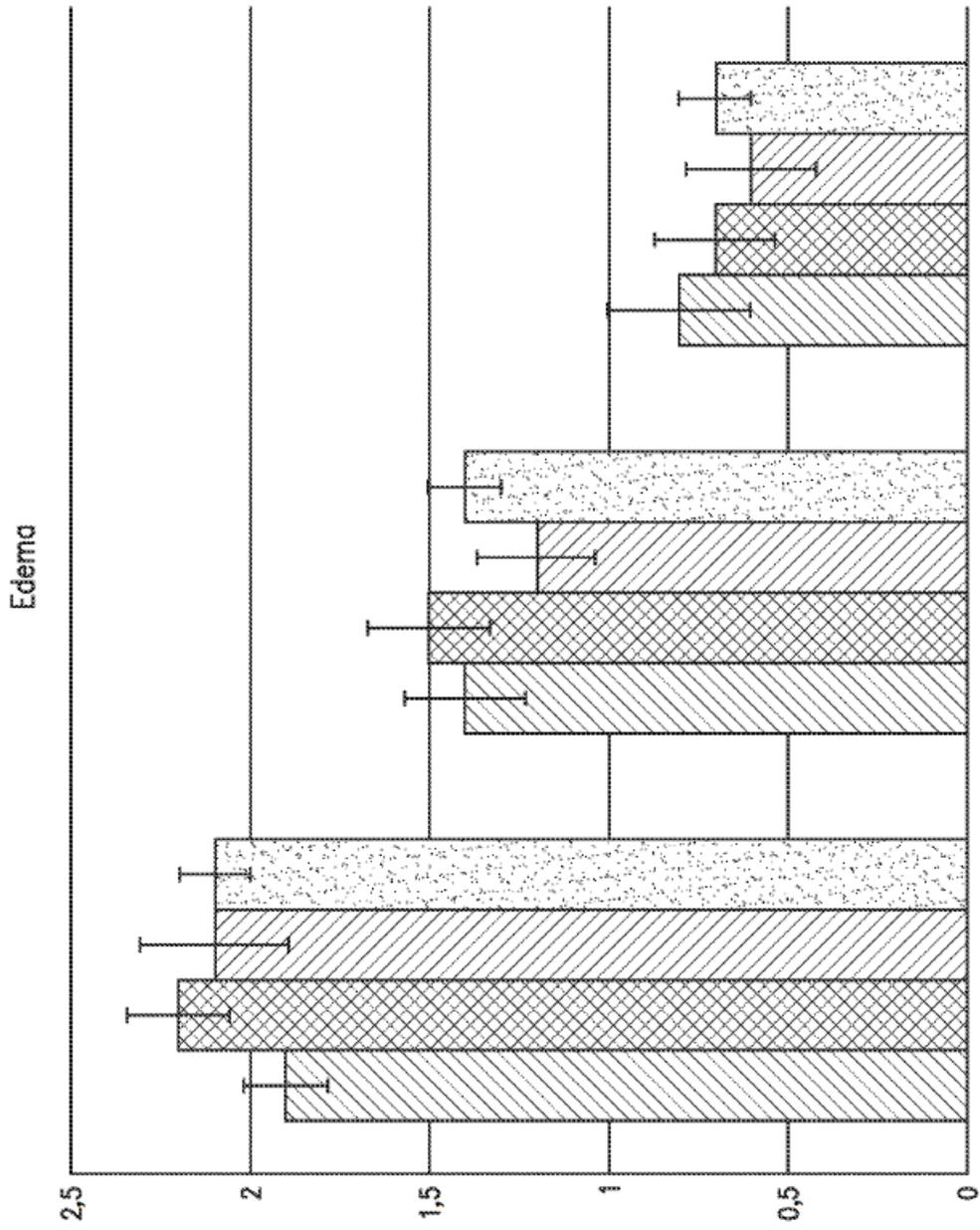


FIG. 7

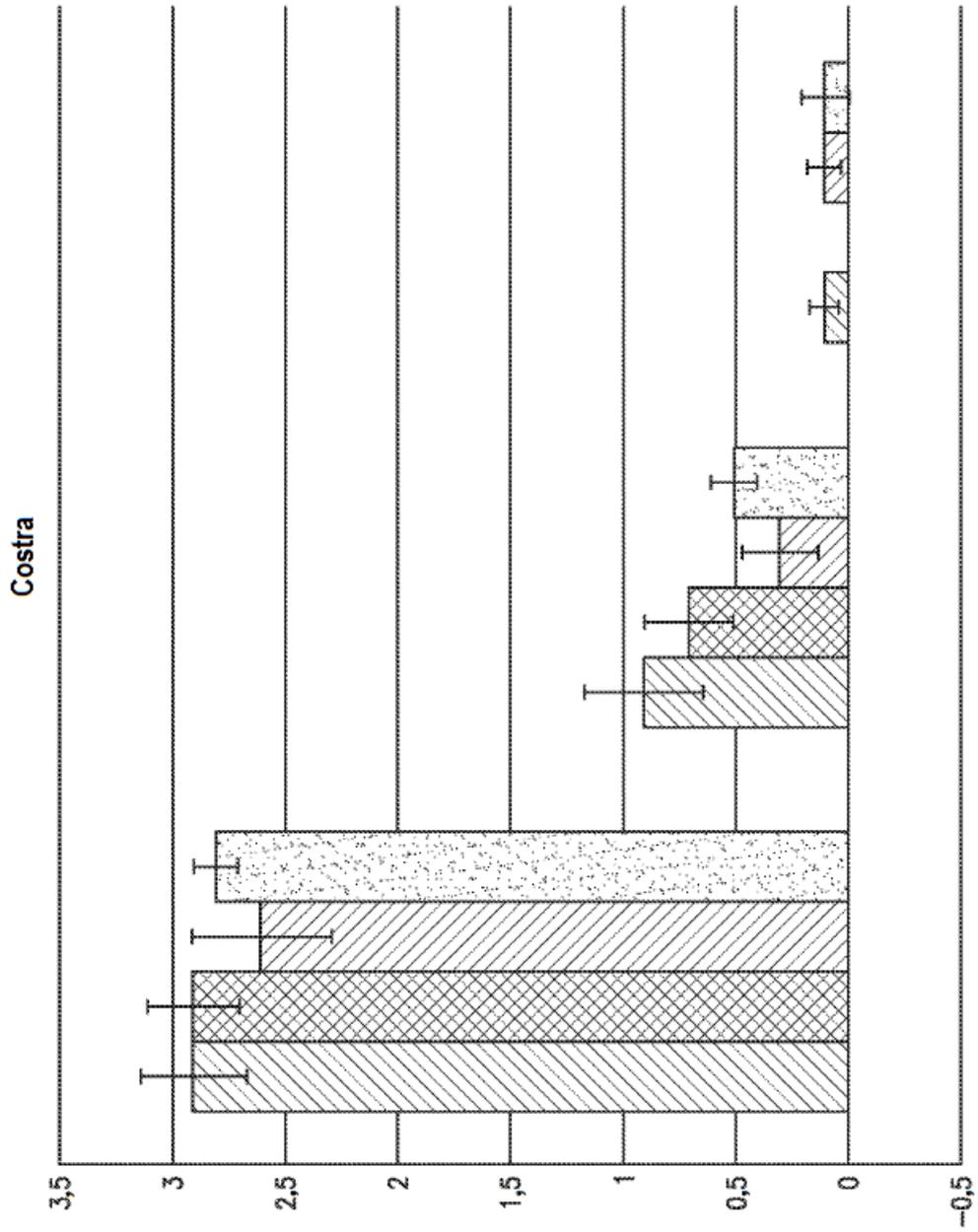


FIG. 8

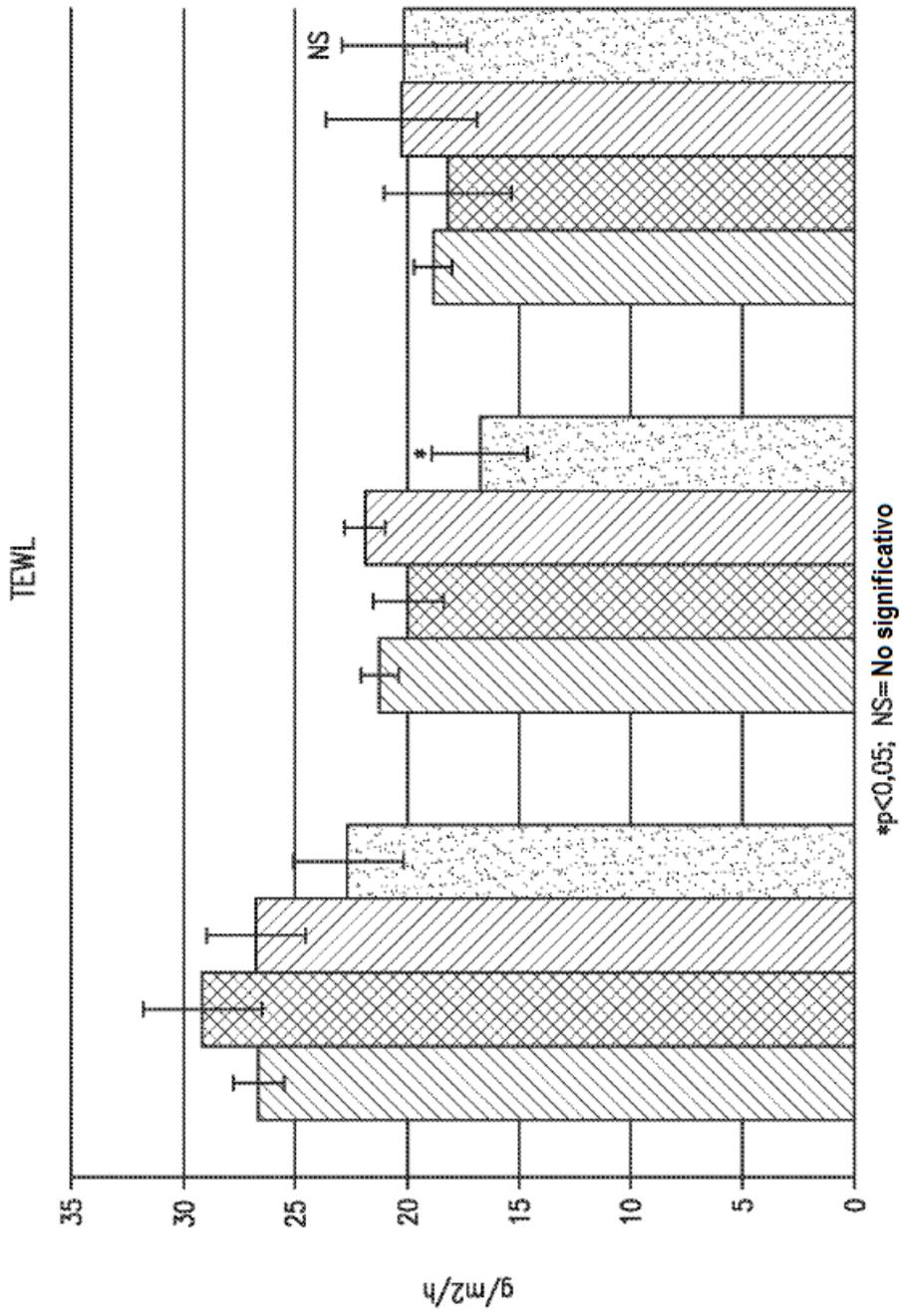


FIG. 9

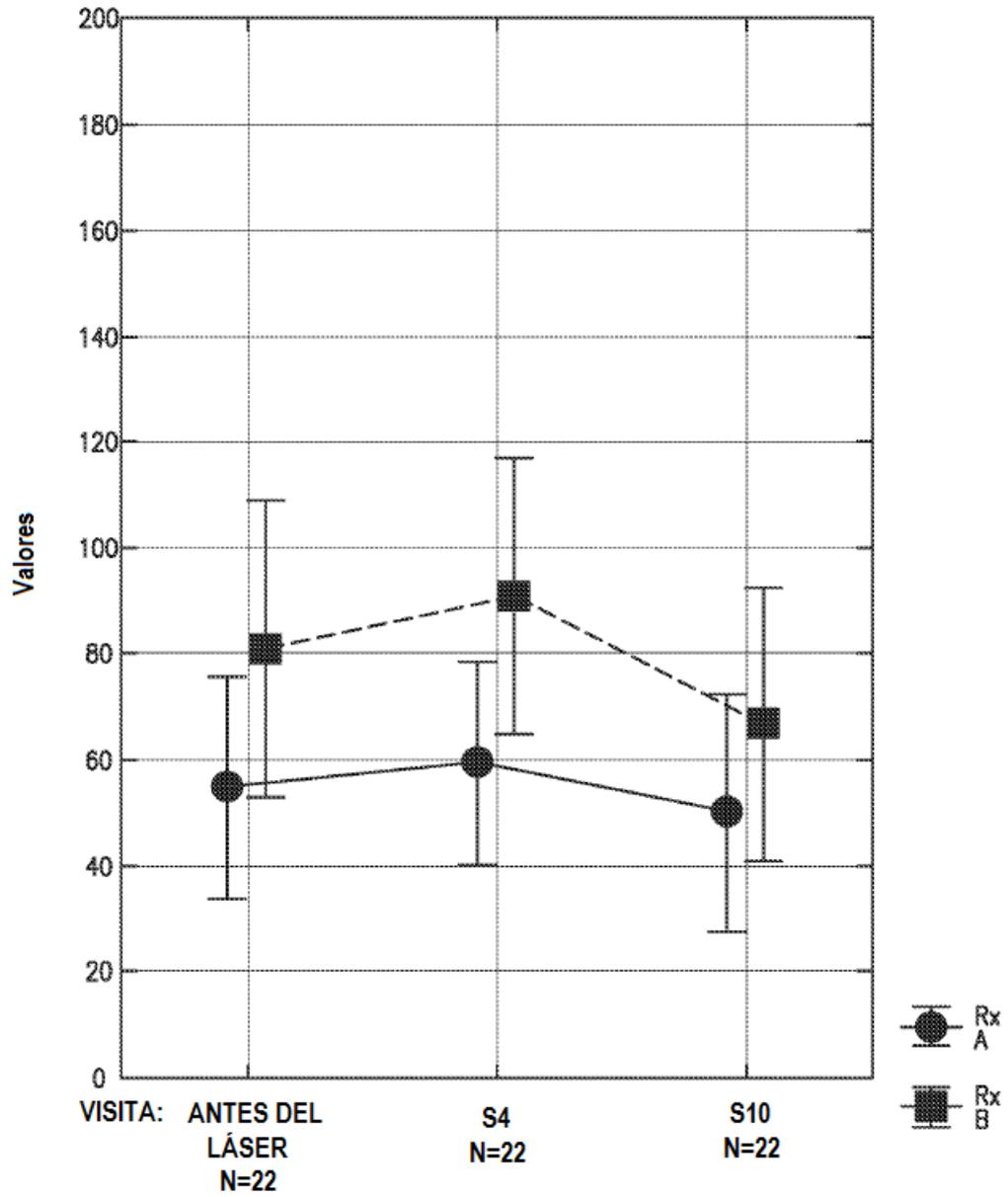


FIG. 10

Días de uso de petrolato

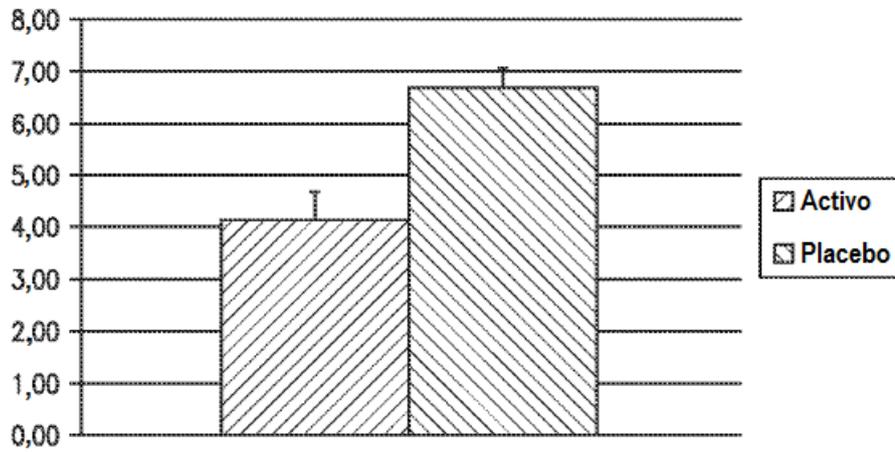


FIG. 11

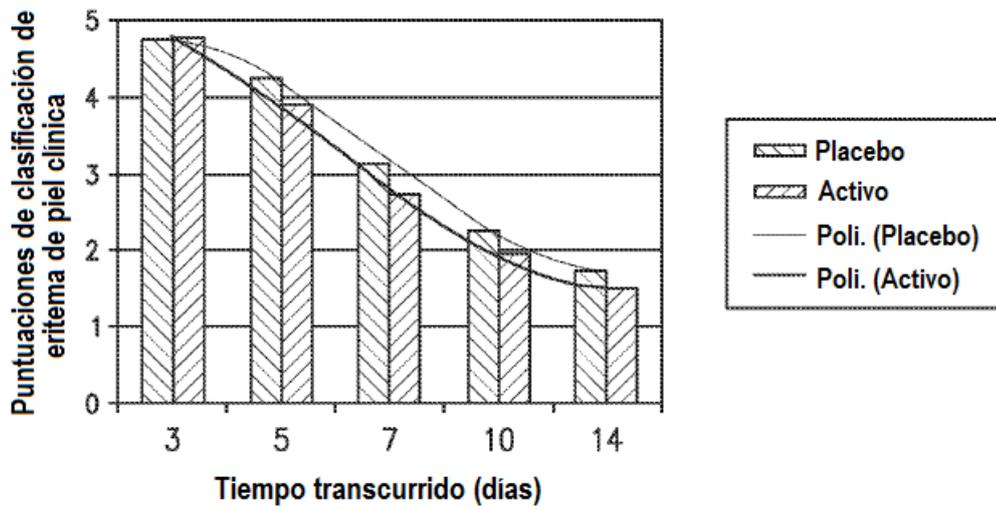


FIG. 12

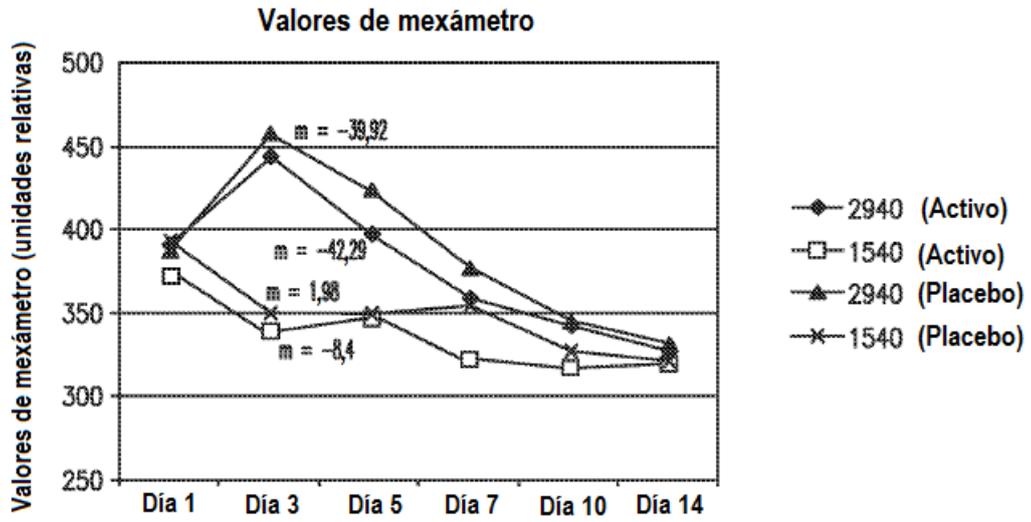


FIG. 13

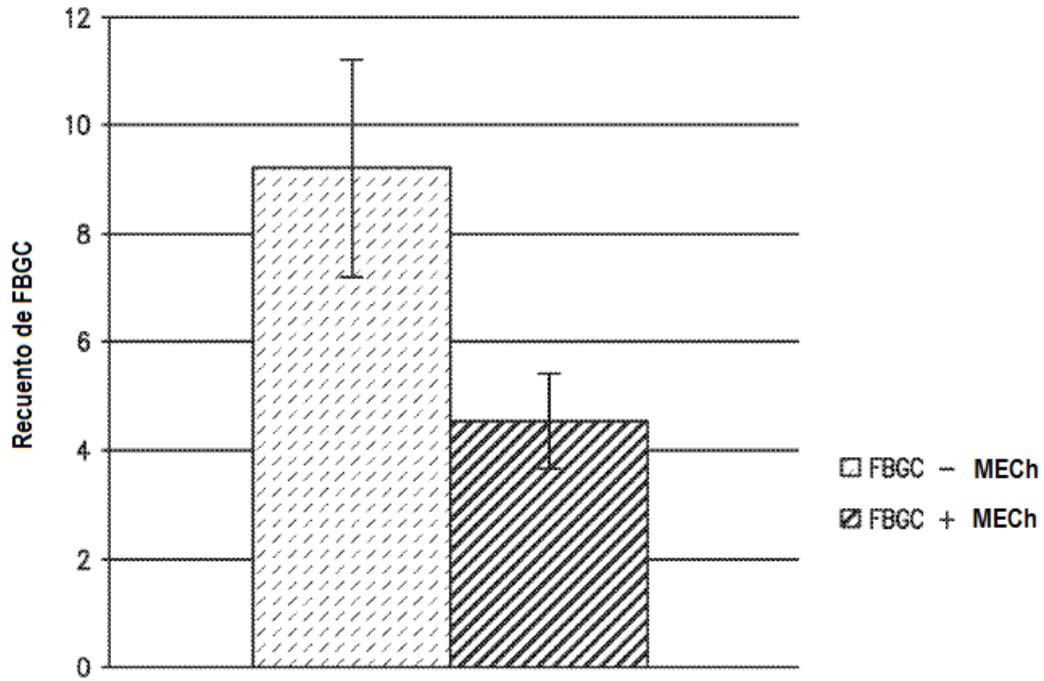


FIG. 14A

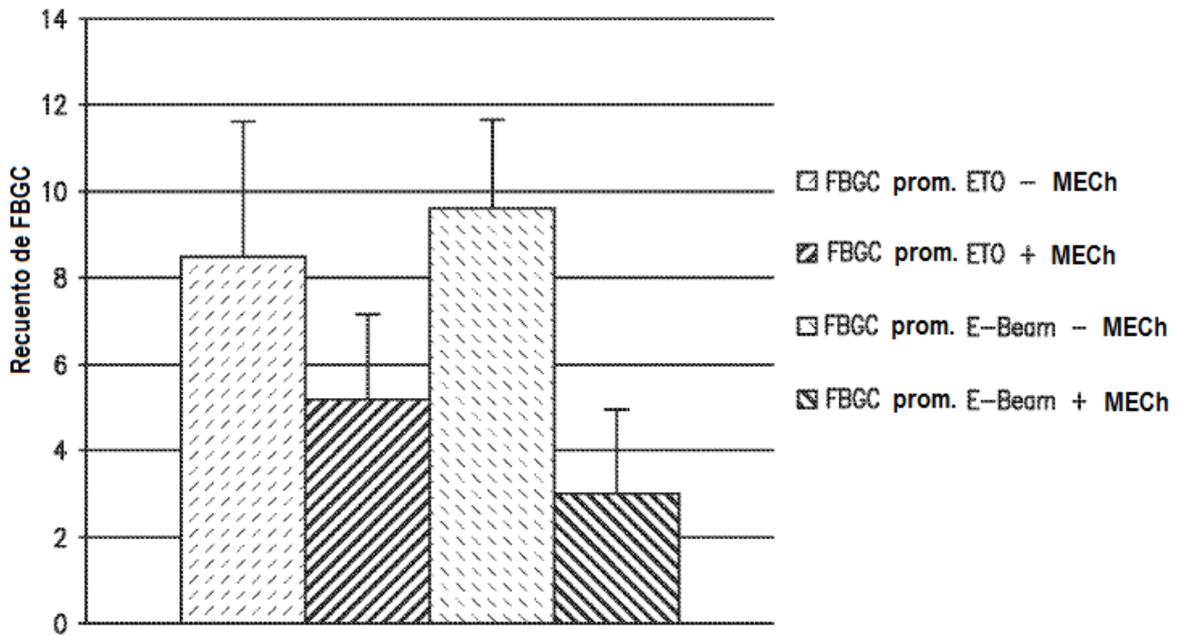


FIG. 14B

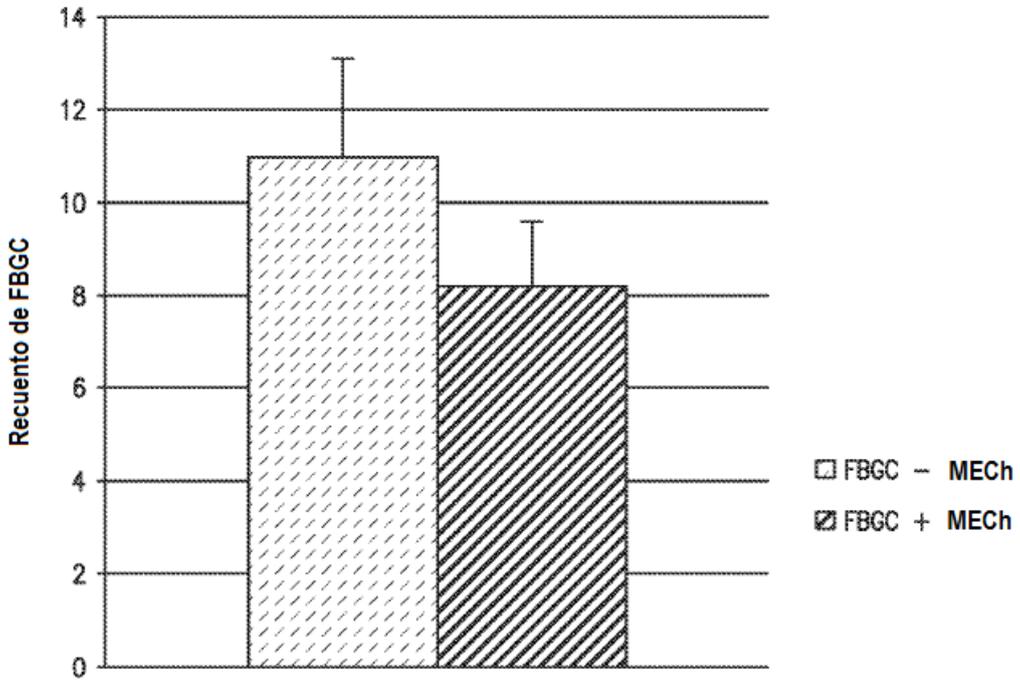


FIG. 15A

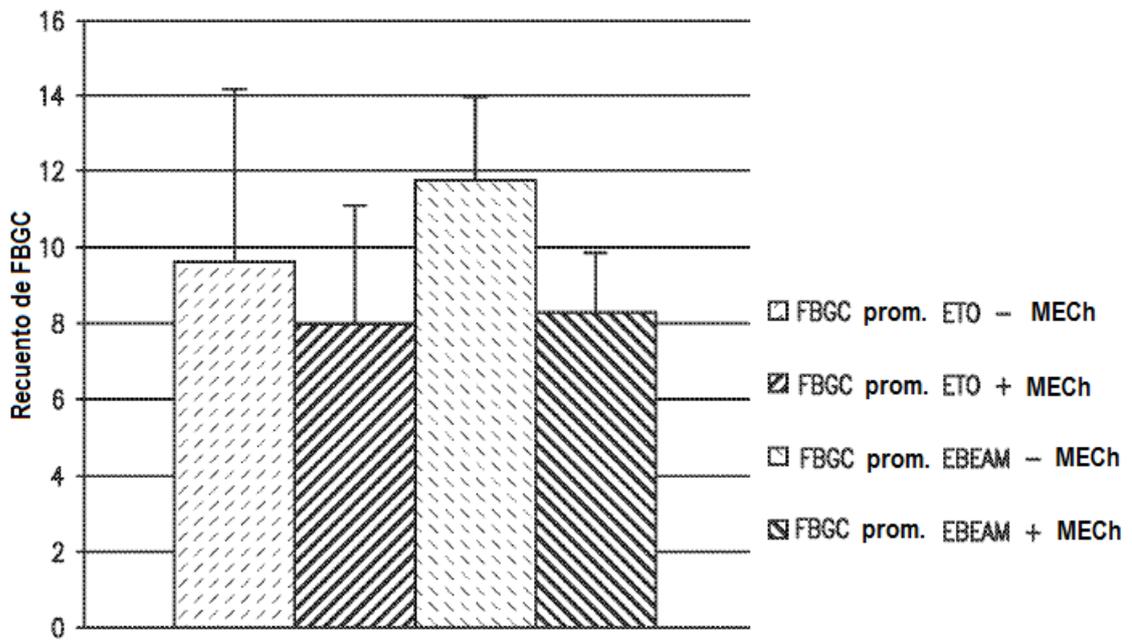


FIG. 15B

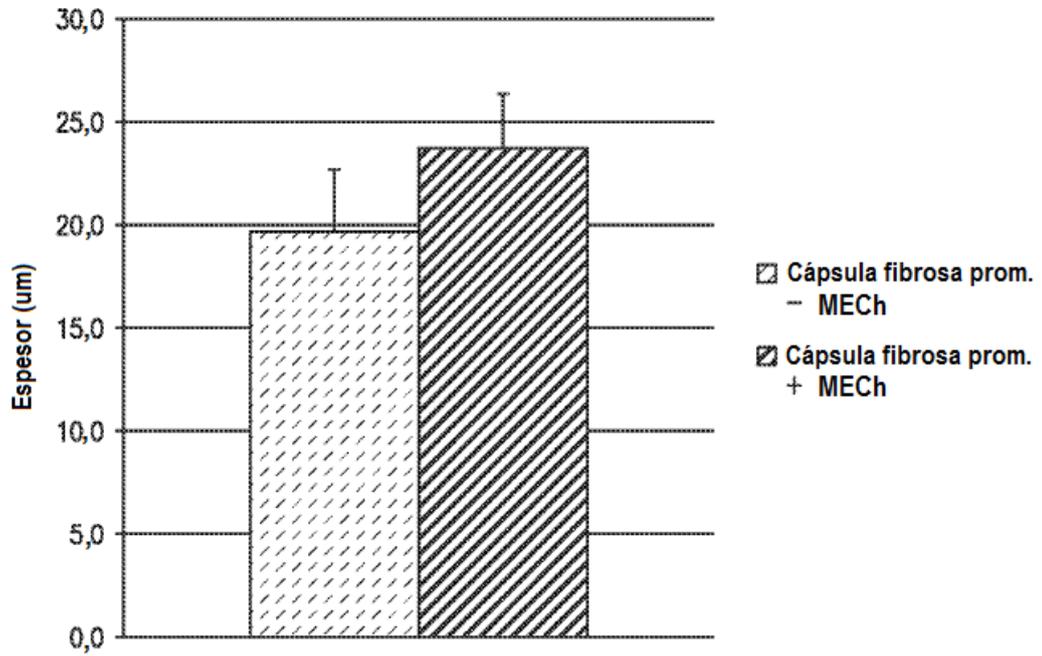


FIG. 16A

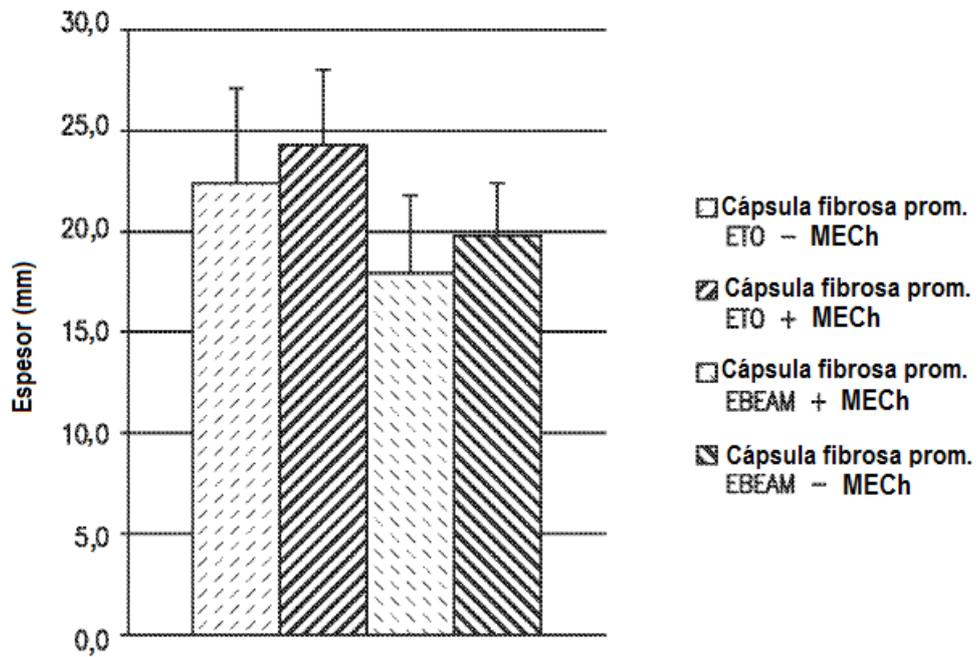


FIG. 16B

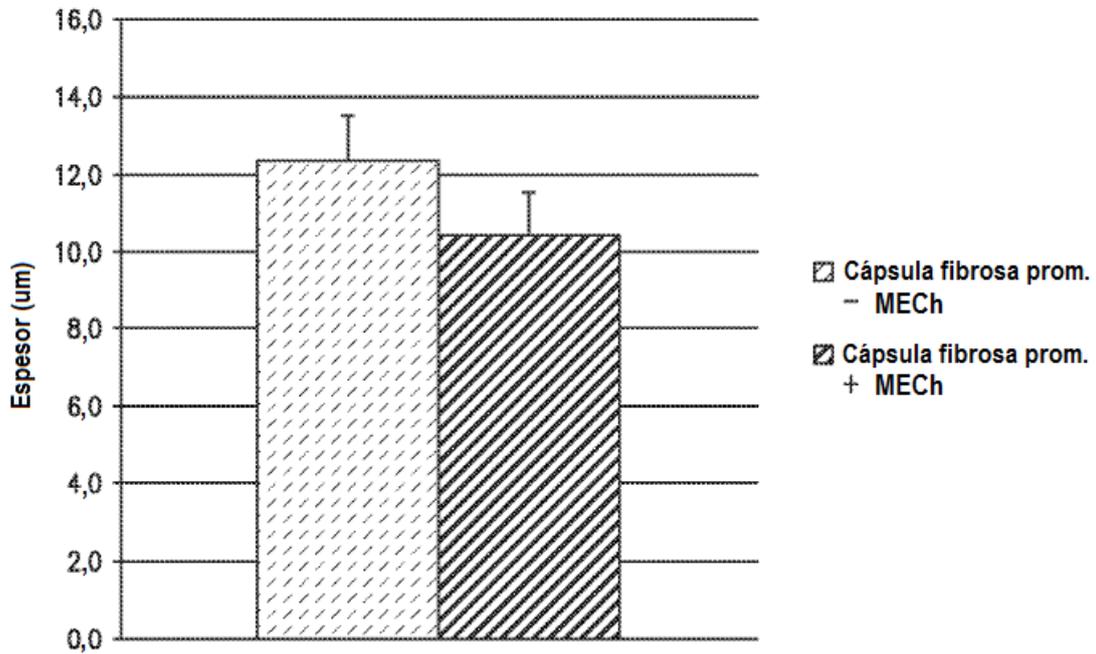


FIG. 17A

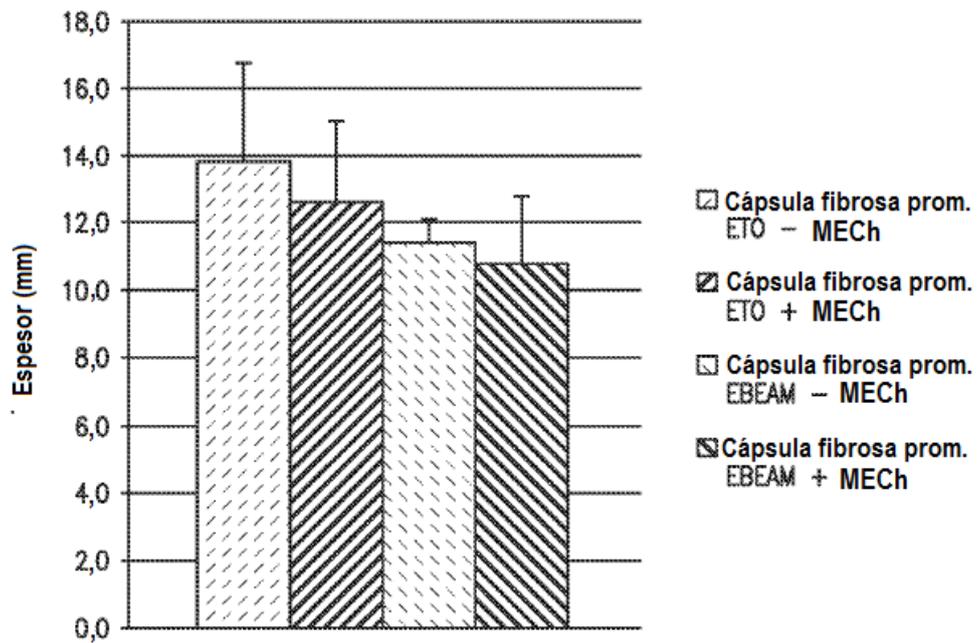


FIG. 17B

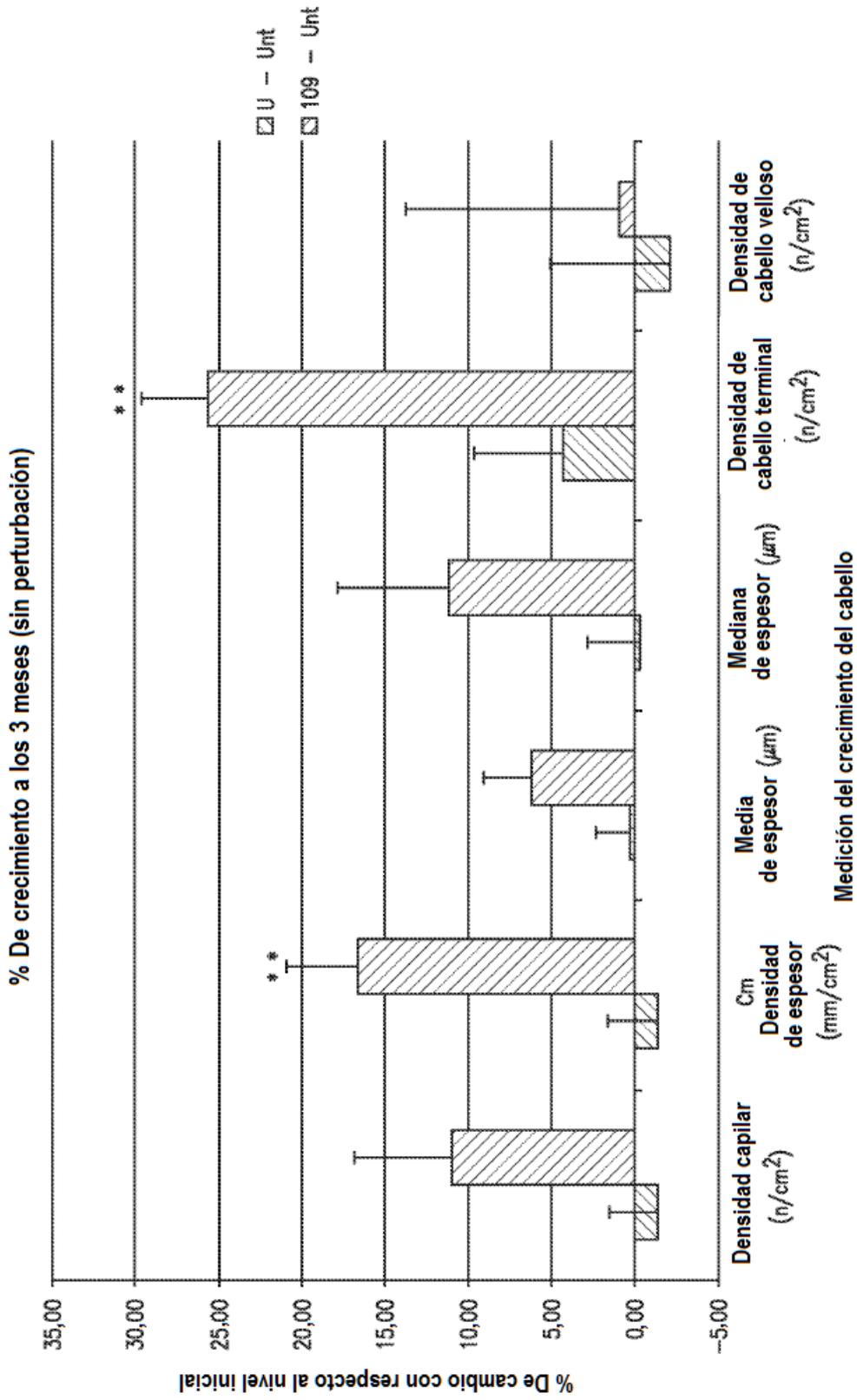


FIG. 18

12 semanas	Sin perturbación		Microdermoabrasión		Palomar		RLLL	
	109	126	109	126	109	126	109	126
Recuento capilar	0,036037*	0,740274	0,630982		0,261192	0,858779	0,261192	0,858779
Densidad (n/cm ²)	0,036037*	0,740274	0,630982		0,261192	0,858779	0,261192	0,858779
Espesor acum. (mm)	0,041777*	0,772055	0,77234		0,473452	0,983672	0,473452	0,983672
Densidad de espesor acum. (mm/cm ²)	0,041777*	0,772055	0,77234		0,473452	0,983672	0,473452	0,983672
Media de espesor (µm)	0,285858	0,822739	0,914817		0,680788	0,490353	0,680788	0,490353
Mediana de espesor (µm)	0,053416**	0,801615	0,423532		0,830499	0,183503***	0,830499	0,183503***
Densidad de cabello terminal (n/cm ²)	0,031394*	0,504405	0,998032		0,840723	0,722296	0,840723	0,722296
Densidad de cabello velloso (n/cm ²)	0,899741	0,689657	0,458447		0,411957	0,913446	0,411957	0,913446
Anágena (%)	0,910408							
Telógena (%)	0,749126							
Velocidad de crecimiento (mm/día)	0,09524**							

* p<0,05
 **0,05<p<0,1
 ***0,1<p<0,2

FIG. 19

22 semanas	Sin perturbación		Microdermoabrasión		Palomar		RIAL	
	109	126	109	126	109	126	109	126
Recuento capilar	0,178419***	0,740274	0,282805	0,124619***	0,858779	0,124619***	0,19438***	0,124619***
Densidad (n/cm ²)	0,178419***	0,740274	0,282805	0,124619***	0,858779	0,124619***	0,19438***	0,124619***
Espesor acum. (mm)	0,100193***	0,772055	0,280809	0,177552***	0,983672	0,177552***	0,672424	0,177552***
Densidad de espesor acum. (mm/cm ²)	0,100193***	0,772055	0,280809	0,177552***	0,983672	0,177552***	0,672424	0,177552***
Media de espesor (µm)	0,048291*	0,822739	0,707774	0,824491	0,490353	0,824491	0,807025	0,824491
Mediana de espesor (µm)	0,018761*	0,801615	0,713708		0,183503		0,830499	
Densidad de cabello terminal (n/cm ²)	0,054341**	0,504405	0,287598	0,287512	0,722296	0,287512	0,818073	0,287512
Densidad de cabello velloso (n/cm ²)	0,47652	0,689657	0,295615	0,834836	0,913446	0,834836	0,779609	0,834836

* p<0,05
 **0,05<p<0,1
 ***0,1<p<0,2

FIG. 20

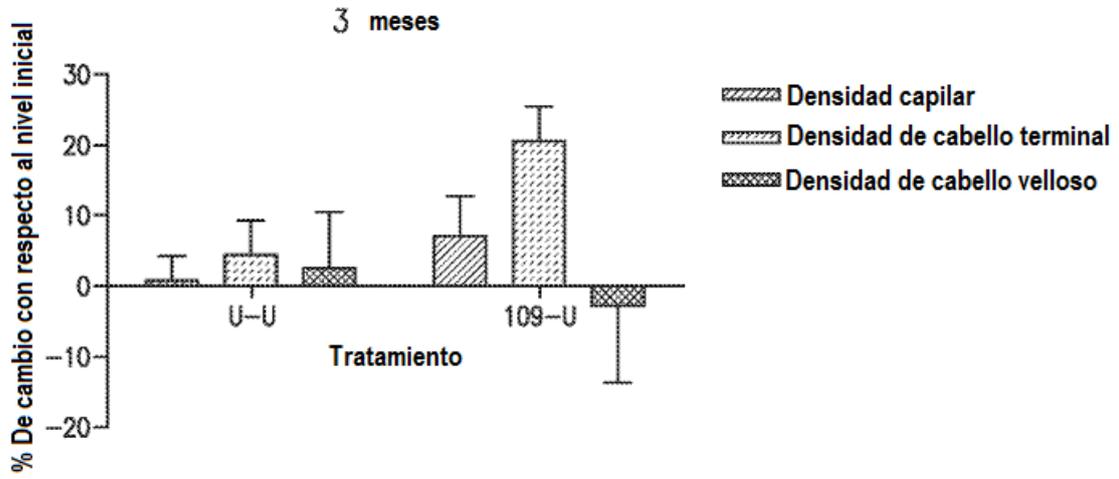


FIG. 21A

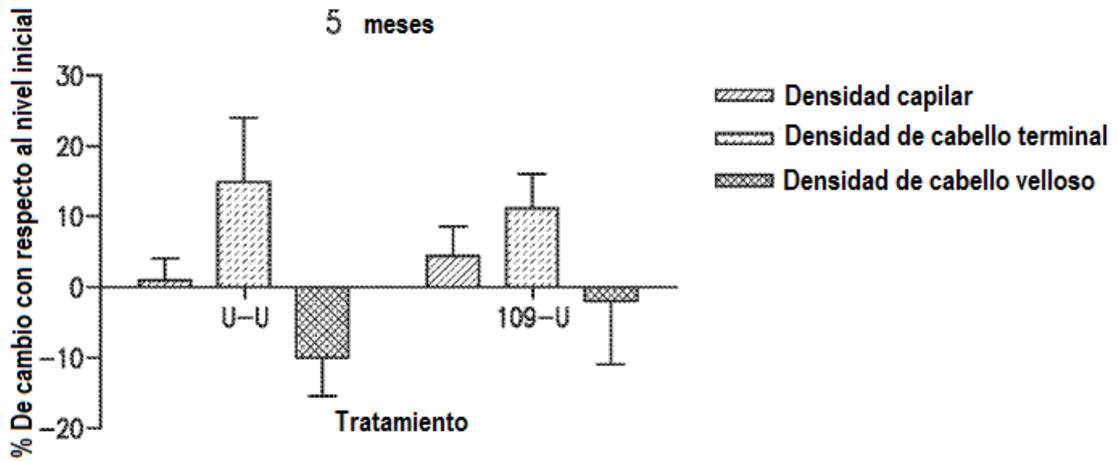


FIG. 21B

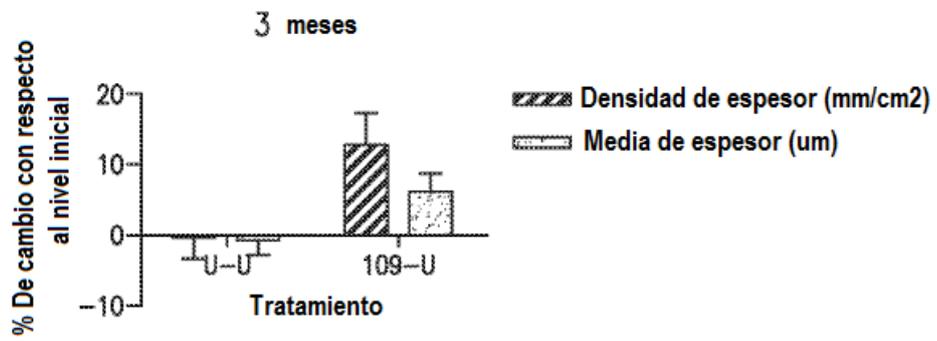


FIG. 22A

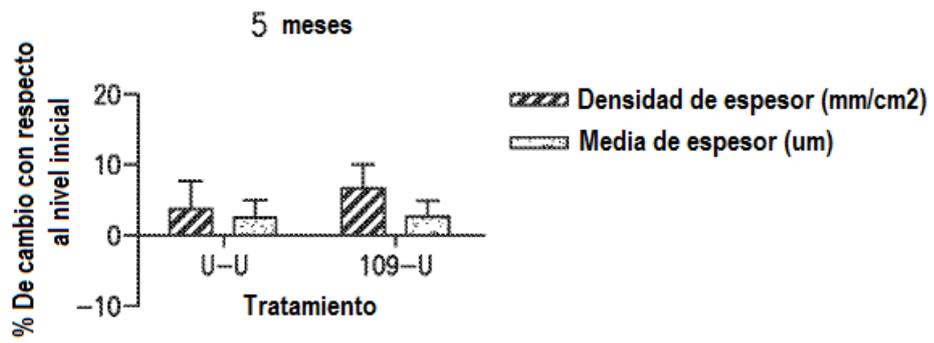


FIG. 22B

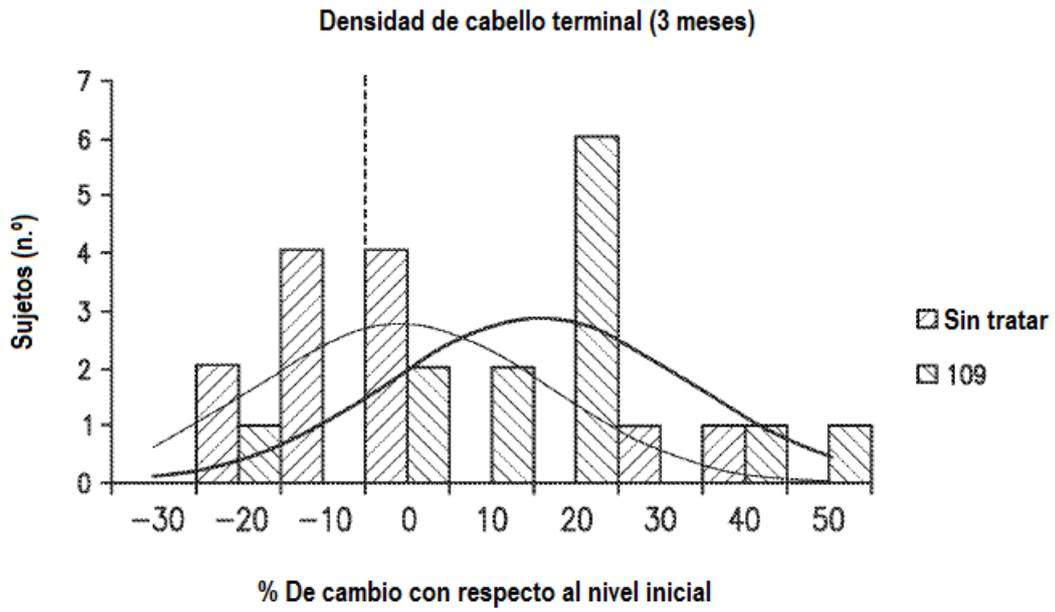


FIG. 23

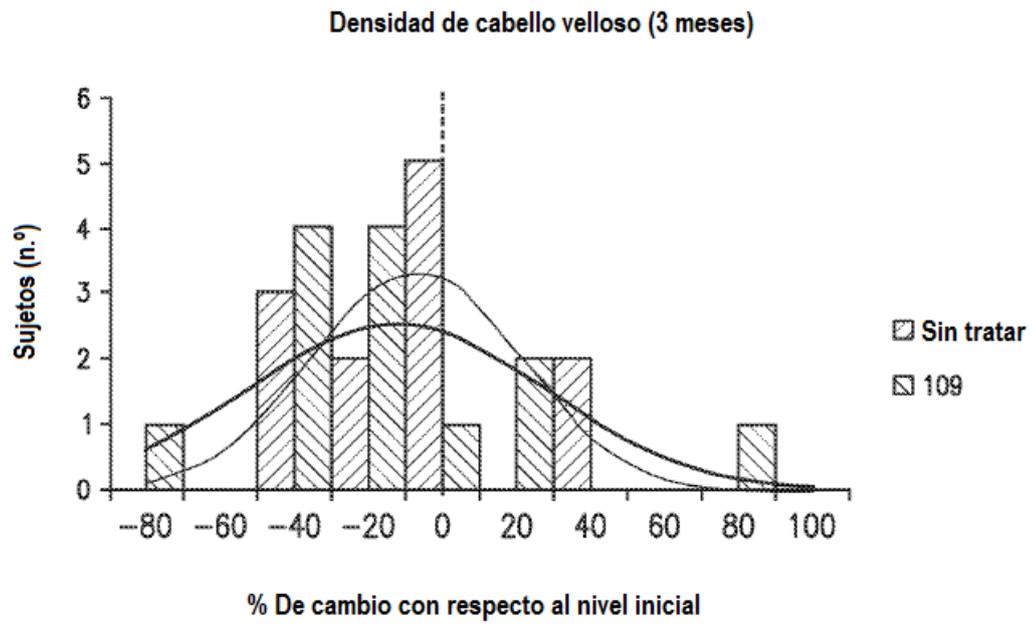


FIG. 24

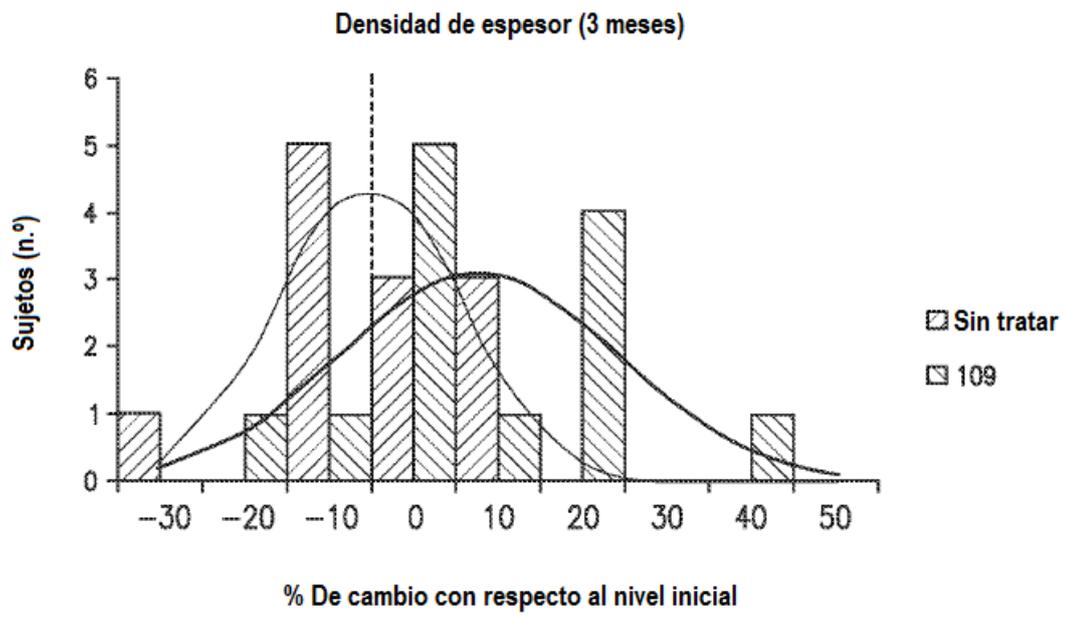


FIG. 25

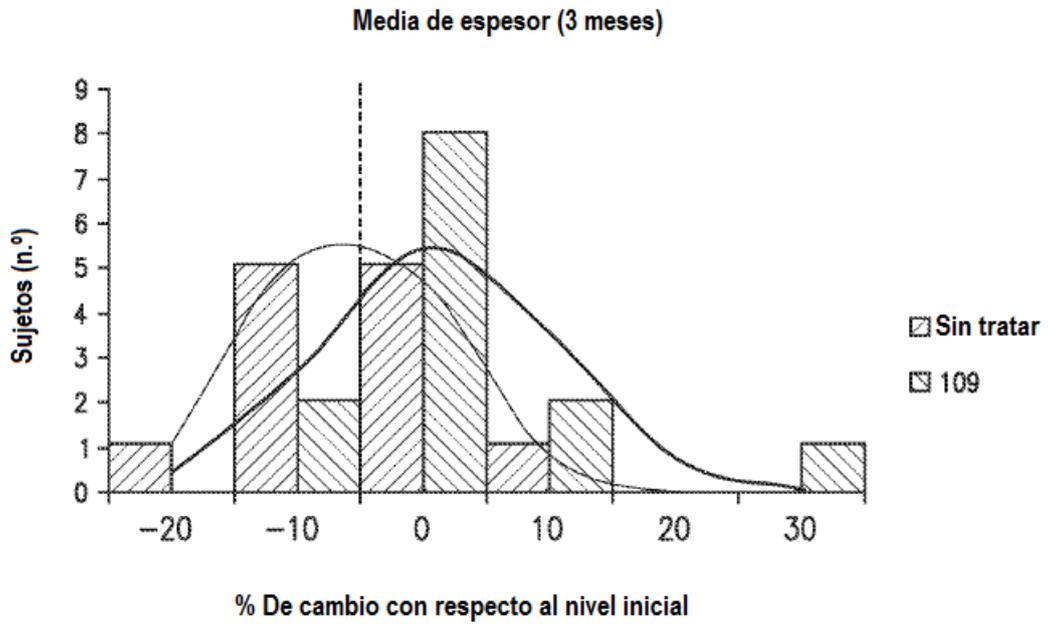
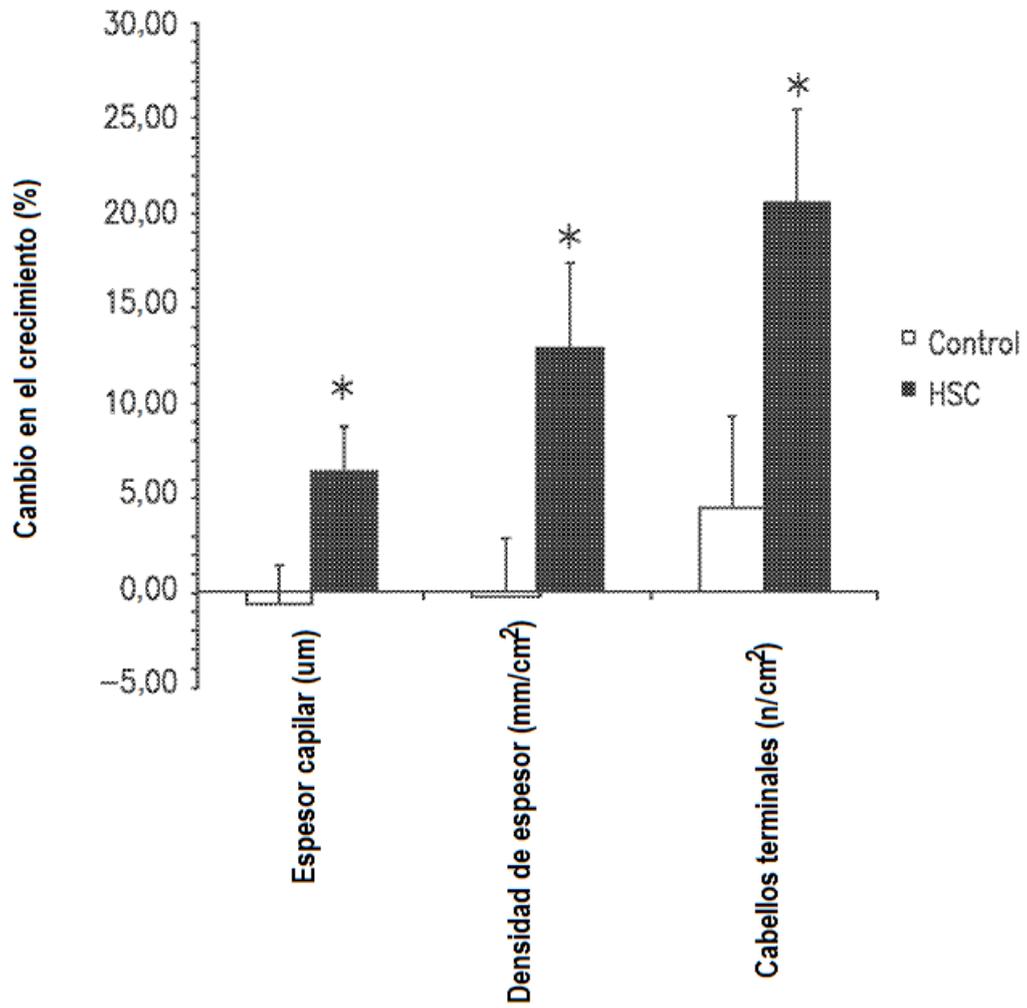


FIG. 26



Medición del crecimiento del cabello

FIG. 27

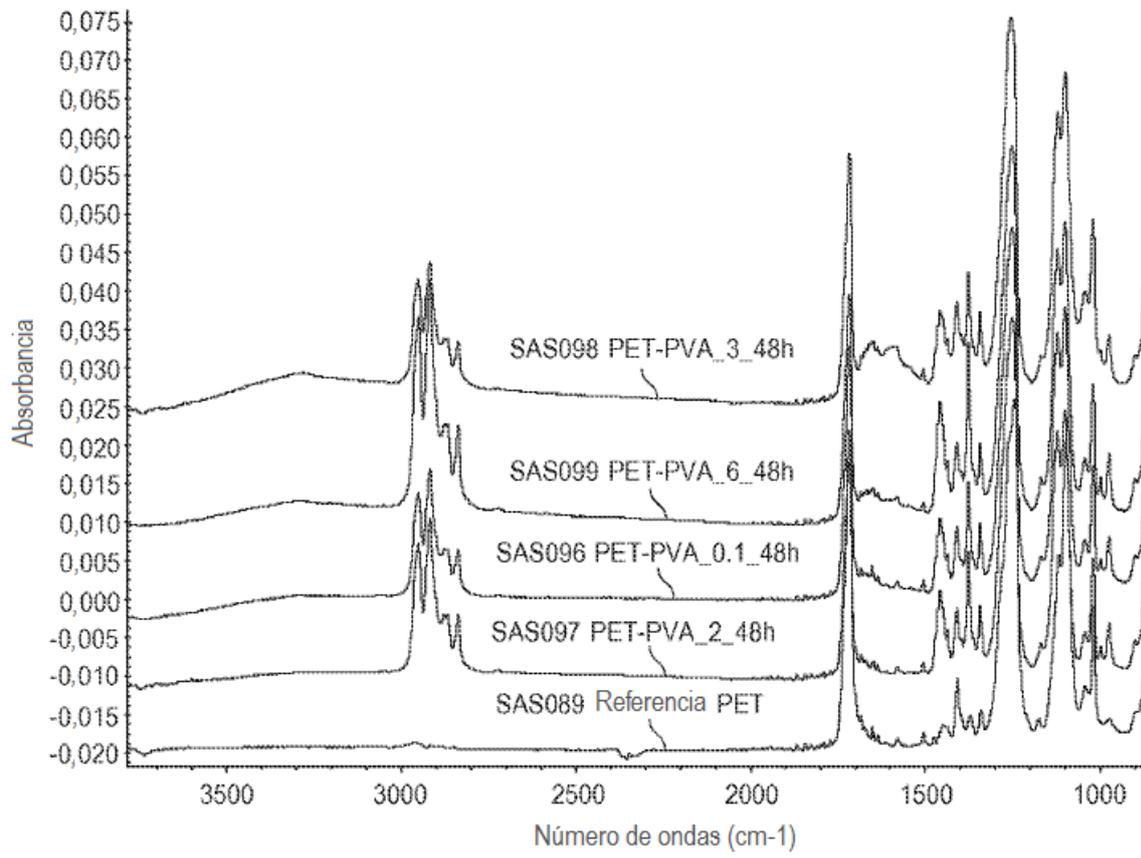


FIG. 28