

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 018**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/36 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2014 PCT/NL2014/050062**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14120013**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2014 E 14703930 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2951288**

54 Título: **Composición y procedimiento de generación de tipo de célula y/o tipo de tejido deseado a partir de células madre de folículo piloso**

30 Prioridad:

01.02.2013 NL 2010222

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

01.10.2018

73 Titular/es:

**GHO, CONRADUS GHOSAL (100.0%)
41 Sterappelstraat
6241 JL Bunde, NL**

72 Inventor/es:

GHO, CONRADUS GHOSAL

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 684 018 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición y procedimiento de generación de tipo de célula y/o tipo de tejido deseado a partir de células madre de folículo piloso

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención está en los campos de la ingeniería de tejido con aplicaciones en los campos de los procedimientos cosméticos y estéticos y la medicina regenerativa. La presente invención proporciona una composición mejorada y procedimiento *in vitro* de generación de un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado a partir de al menos una célula madre de folículo piloso. La composición mejorada y el procedimiento *in vitro* de la presente invención son particularmente adecuados para el trasplante cosmético o terapéutico de células y/o tejidos en áreas receptoras de un sujeto que experimenta pérdida de células y/o tejido causada por una herida, cicatriz, lesión por quemadura, degeneración tisular, enfermedades y/o envejecimiento. La composición y el procedimiento *in vitro* de la presente invención también son particularmente adecuados para evitar las complicaciones relacionadas con infecciones y/o rechazo inmunitario de un implante o injerto cosmético o terapéutico de células y/o tejido en un sujeto.

Antecedentes de la invención

20

[0002] En la última década ha aumentado espectacularmente el interés por las células madre pluripotentes, particularmente con respecto a su función en los campos rápidamente en extensión de la ingeniería de tejido, medicina regenerativa y tecnología de rejuvenecimiento facial, así como corporal. Las células madre pluripotentes naturales son células dotadas con el potencial de diferenciarse en cualesquiera de los tipos de células fetales o adultas. La obtención de dichas células está, sin embargo, altamente limitada y constantemente se somete a graves problemas éticos puesto que las células madre pluripotentes naturales son de origen embrionario y así solo se pueden obtener de un embrión. Por tanto, se han dedicado intensos esfuerzos de investigación para descubrir fuentes no embrionarias alternativas de células madre pluripotentes que estén libre de problemas éticos.

[0003] Un descubrimiento muy importante reveló que las células madre no embrionarias (también denominadas células madre adultas o células madre somáticas) existen en casi todos los tejidos adultos del cuerpo. Ejemplos de células madre no embrionarias incluyen células madre mesenquimatosas, células madre hematopoyéticas, células madre epiteliales, células madre dérmicas y células madre neurales, células madre de folículo piloso, y otras. A diferencia de las células madre embrionarias, las células madre no embrionarias son multipotentes en vez de pluripotentes. Las células madre multipotentes tienen el potencial de dar lugar a células de múltiples linajes, pero no todos los linajes. En otras palabras, las células madre no embrionarias no pueden diferenciarse naturalmente en cualquier tipo de células, al menos no sin experimentar manipulaciones artificiales. De hecho, se descubrió que las células madre no embrionarias multipotentes se pueden inducir artificialmente para llegar a ser pluripotentes en ámbitos de laboratorio induciendo la forzosa expresión de ciertos genes. Dichas células artificialmente transformadas también se denominan "célula madre pluripotente inducida". Sin embargo, el uso de células madre pluripotentes inducidas es controvertido puesto que tales células son frecuentemente altamente tumorigénicas.

[0004] Otro descubrimiento muy importante reveló que no solo las células madre de folículo piloso parecen escapar del destino tumorigénico, sino que también muestran una alta capacidad proliferativa y clonigénica mientras que tienen el potencial de diferenciarse, sin embargo, en condiciones artificiales, en una variedad de tejidos diferentes que incluyen tejido neural, tejido ocular (por ejemplo, tejido del epitelio pigmentario de la retina), tejido cardíaco (por ejemplo, cardiomiocitos), tejido dental, tejido adipogénico, tejido condrogénico, tejido osteogénico y linajes miogénicos similares a médula ósea, y otros. Por tanto, debido a su amplio potencial regenerativo, la gran accesibilidad y calidad no oncogénica, las células madre de folículo piloso se consideran actualmente una de las fuentes más prometedoras de células madre no embrionarias para la ingeniería de tejido, tecnología de trasplante de tejido, tecnología de rejuvenecimiento facial y corporal, y otras tecnologías cosméticas, así como procedimientos terapéuticos (por ejemplo, medicina regenerativa).

[0005] Otro campo rápidamente en desarrollo es el campo de los "productos autólogos" y tratamientos cosméticos y procedimientos terapéuticos relacionados, que se basan en el principio de tomar las propias proteínas, células o tejidos de un sujeto y reintroducirlos de nuevo en el mismo sujeto. Tal tecnología es particularmente ventajosa en los campos de la ingeniería cosmética de tejidos, tecnología de trasplante de tejido y tecnología de rejuvenecimiento facial y corporal, procedimientos terapéuticos (por ejemplo, medicina regenerativa) y otros, puesto

que previene la aparición de complicaciones relacionadas con el rechazo inmunitario y/o la infección. Por tanto, es actualmente elevado el interés en células madre de folículo piloso, especialmente de fuentes autólogas, particularmente para el desarrollo de procedimientos mejorados para manipular eficientemente células madre de folículo piloso *in vitro*. Específicamente, debido a que el número de células madre de folículo piloso que se pueden recoger de pelos de donante es relativamente pequeño en comparación con la gran cantidad de células madre de folículo piloso necesarias, por ejemplo, en ingeniería cosmética de tejidos, tecnología de trasplante de tejidos y tecnología de rejuvenecimiento facial y corporal, procedimientos terapéuticos (por ejemplo, medicina regenerativa) y otros, existe una necesidad creciente de procedimientos *in vitro* mejorados de cultivo y expansión (multiplicar su número o reforzar la proliferación) de células madre de folículo piloso. En paralelo, también existe una gran necesidad de procedimientos *in vitro* mejorados y composiciones para generar tipos de células y/o tipos de tejido deseados a partir de células madre de folículo piloso, particularmente las generadas de cultivo *in vitro*. Más exactamente, existe una gran necesidad de composiciones mejoradas específicas de células o específicas de tejido, en particular composiciones autólogas específicas de células o específicas de tejido, que permitan que las células madre de folículo piloso proliferen y se diferencien en un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado de un modo más eficiente.

[0006] Generalmente, los medios de diferenciación para células madre mesenquimatosas tales como células madre de folículo piloso comprenden suero bovino fetal. El suero es una fuente importante de contaminantes virales que, una vez presentes, son difíciles de retirar de los cultivos. Puede contener virus, priones y micoplasma, que pueden distorsionar los resultados de los experimentos científicos y puede transferir enfermedades a la célula cultivada. Además, un considerable debate ético rodea la producción del suero bovino fetal. Existe en la técnica una necesidad de medios de proliferación y diferenciación que carezcan de suero bovino fetal.

Resumen de la invención

[0007] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición para generar un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado a partir de al menos una célula madre de folículo piloso, comprendiendo dicha composición al menos un compuesto antiapoptótico, donde dicho agente antiapoptótico es un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable, al menos un compuesto antioxidante, al menos un compuesto potenciador de células madre, al menos un compuesto de la matriz extracelular y al menos un factor inductor de la diferenciación.

[0008] El compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable se puede seleccionar del grupo que consiste en bis(maltolato)oxovanadio, oxovanadio y ortovanadio, y es preferentemente bis(maltolato)oxovanadio.

[0009] Uno o más segundos o más compuestos antiapoptóticos seleccionados del grupo de una triyodotironina, estradiol, progesterona, extracto de tejido, insulina, transferrina, selenio, L-cisteína, adenosina trifosfato-cloruro de magnesio y L-leucina se incluir adicionalmente en la composición enseñada en el presente documento.

[0010] El extracto de tejido puede ser extracto bovino de pituitaria.

[0011] En una realización, el compuesto antioxidante está seleccionado del grupo de quercetina, monohidroxietilrutósido, vitamina C, ácido lipoico, mesilato de deferoxamina y vitamina E, preferentemente de quercetina y mono-hidroxietilrutósido.

[0012] En una realización, el compuesto potenciador de células madre se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina, célula CD34-positiva y ácido retinoico, preferentemente del grupo de eritropoyetina y célula CD34-positiva. En una realización adecuada, el compuesto potenciador de células madre es eritropoyetina.

[0013] La eritropoyetina y/o la célula CD34-positiva pueden derivar de sangre periférica o médula ósea de un sujeto donante. La célula CD34-positiva se puede obtener o se obtiene de una línea celular CD34-positiva, por ejemplo, una línea celular CD34-positiva humana.

[0014] La composición enseñada en el presente documento puede comprender además al menos un agente desgranulante, por ejemplo, el compuesto 48/80.

[0015] La composición enseñada en el presente documento puede comprender además una sal inorgánica, tal como CaCl_2 .

- [0016]** En una realización, el compuesto de la matriz extracelular se selecciona del grupo de: plasma rico en plaquetas, laminina, colágeno IV, sulfato de heparina, entactina y sulfato de condroitina.
- [0017]** En una realización, el compuesto de la matriz extracelular es plasma rico en plaquetas, que puede derivar de sangre periférica de un sujeto donante.
- 5 **[0018]** La composición enseñada en el presente documento puede comprender además uno o más componentes seleccionados del grupo de albúmina, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, oligoelementos, constituyentes orgánicos, complemento de crecimiento y antibióticos.
- 10 **[0019]** El tipo de célula deseado se puede seleccionar del grupo de célula nerviosa, célula fotorreceptora, cardiomiocito, odontoblasto, célula epitelial, célula de queratinocito, célula de fibroblasto, célula grasa, glóbulo sanguíneo, célula inmunitaria, célula muscular, célula dérmica, célula de folículo piloso, osteoblasto, osteocito, osteoclasto y condrocito.
- 15 **[0020]** El tipo de tejido deseado se puede seleccionar del grupo de tejido neural, tejido ocular, tejido cardíaco, tejido dental, tejido epitelial, tejido de queratinocito, tejido de fibroblasto, tejido conjuntivo, tejido adiposo, tejido muscular, tejido dérmico, tejido piloso, tejido óseo y tejido de cartílago.
- [0021]** El factor inductor de la diferenciación se puede seleccionar del grupo que consiste en factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento de insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, taurina, activina A y 5-azacitidina.
- 20 **[0022]** El factor de crecimiento similar a la insulina se puede seleccionar del grupo que consiste en factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 y factor de crecimiento similar a la insulina tipo 2.
- 25 **[0023]** El factor inductor de la diferenciación puede ser factor de crecimiento epidérmico, y dicho tipo de célula y/o tipo de tejido deseado es tipo de célula y/o tejido epidérmico, tipo de célula y/o tejido dérmico, tipo de célula y/o tejido de vaso sanguíneo, o tipo de célula y/o tejido óseo. El factor de crecimiento epidérmico se puede seleccionar del grupo que consiste en: factor de crecimiento de tipo crecimiento epidérmico de unión a heparina, epiregulina, epigen, betacelulina, neuregulina-1, neuregulina-2, neuregulina-3 y neuregulina-4.
- 30 **[0024]** El factor inductor de la diferenciación puede ser factor de crecimiento transformante, y dicho tipo de célula y/o tipo de tejido deseado es tipo de célula y/o tejido de cartílago, tipo de célula y/o tejido de válvula cardíaca y tipo de célula y/o tejido de músculo esquelético. El factor de crecimiento transformante se puede seleccionar del grupo que consiste en: factor de crecimiento transformante alfa y factor de crecimiento transformante beta.
- [0025]** El factor inductor de la diferenciación se selecciona de activina A, taurina y factor de crecimiento epidérmico, y dicho tipo de célula y/o tipo de tejido deseado es célula fotorreceptora y/o tejido retiniano.
- 40 **[0026]** El factor inductor de la diferenciación puede ser factor de crecimiento de fibroblastos, y dicho tipo de célula y/o tipo de tejido deseado es célula de fibroblasto, célula dérmica y/o tejido dérmico, o célula de vaso sanguíneo y/o tejido de vaso sanguíneo.
- 45 **[0027]** El factor inductor de la diferenciación puede ser factor de crecimiento epitelial, y dicho tipo de célula y/o tipo de tejido deseado es célula de queratinocito y/o tejido de queratinocito.
- [0028]** La composición enseñada en el presente documento puede comprender además un medio de crecimiento sin suero.
- 50 **[0029]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* de generación de un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado a partir de al menos una célula madre de folículo piloso, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 55 proporcionar al menos una célula madre de folículo piloso;
cultivar la al menos una célula madre de folículo piloso en un medio para obtener una población de células madre de folículo piloso;
poner en contacto la población de células madre de folículo piloso de la etapa (b) con una composición enseñada en el presente documento y permitir que dicha población de células madre de folículo piloso se diferencie en el tipo de

célula y/o tipo de tejido deseado en condiciones favorables para la diferenciación; y recoger el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado.

5 **[0030]** La al menos una célula madre de folículo piloso de etapa (a) se puede obtener de al menos una parte de un folículo piloso en la fase anágena. La al menos una parte de un folículo piloso en la fase anágena se puede haber obtenido arrancando un pelo de un área de un sujeto donante.

[0031] La al menos una parte de un folículo piloso se puede poner en contacto con un medio que comprende colagenasa IV.

10 **[0032]** La célula madre de folículo piloso es preferentemente una célula madre de folículo piloso humana.

[0033] El medio es preferentemente un medio de crecimiento sin suero, opcionalmente complementado adicionalmente con al menos un extracto de tejido, por ejemplo, un compuesto de extracto bovino de pituitaria.

15 **[0034]** El tipo de célula y/o tipo de tejido deseado se destina preferentemente para la introducción en una región receptora en un sujeto, y donde la al menos una célula madre de folículo piloso de la etapa (a) deriva de dicho sujeto, y donde la composición de la etapa (c) comprende al menos una célula CD34-positiva derivada de dicho sujeto y/o plasma rico en plaquetas derivado de dicho sujeto.

20 **[0035]** En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenible u obtenido por el procedimiento *in vitro* enseñado en el presente documento para un fin cosmético.

[0036] La invención también se refiere al uso de un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenible por el procedimiento *in vitro* enseñado en el presente documento para la reparación y/o cicatrización cosmética de tejido.

25 **[0037]** La invención se refiere además al uso de un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenible por el procedimiento *in vitro* enseñado en el presente documento para el rejuvenecimiento cosmético facial y corporal.

[0038] La invención proporciona además el uso de un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenible por el procedimiento *in vitro* enseñado en el presente documento para medicina regeneradora.

30 **[0039]** Finalmente, la presente invención se refiere a un kit que comprende la composición enseñada en el presente documento, opcionalmente con un folleto que comprende información escrita sobre cómo usar la composición enseñada en el presente documento para generar una tipo de célula y/o de tejido deseado.

35 **Descripción detallada de la invención**

DEFINICIONES GENERALES

40 **[0040]** El término 'compuesto antiapoptótico', como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto capaz de prevenir o reducir la apoptosis. El término 'compuesto antiapoptótico' se usa comúnmente por el experto para describir compuestos o sustancias que tienen actividad antiapoptótica. Ejemplos no limitantes de compuestos antiapoptóticos incluyen: compuestos de vanadio fisiológicamente aceptables (por ejemplo, bis(maltolato)oxovanadio, oxovanadio, ortovanadio), triyodotironina, estradiol, progesterona, insulina, transferrina, selenio, L-cisteína, L-leucina, adenosina trifosfato-cloruro de magnesio, extracto de tejido (por ejemplo, extracto bovino de pituitaria), y otros.

50 **[0041]** El término 'compuesto antioxidante', como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto capaz de inhibir o reducir la oxidación de otras moléculas y/o contrarrestar los efectos del estrés oxidativo en una célula y/o tejido. El experto conoce bien el significado del término 'antioxidante' y lo reconoce como una categoría muy conocida categoría de compuestos usada en diversas composiciones o productos. Ejemplos no limitantes de antioxidante incluyen: quercetina, monohidroxiethylrutósido, vitamina C, ácido lipoico, mesilato de deferoxamina, vitamina E, y otros.

55 **[0042]** El término 'compuesto potenciador de células madre', como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto capaz de potenciar la reprogramación de una célula madre o diferenciación de una célula madre en un tipo de tejido deseado. Los compuestos potenciadores de células madre también se usan comúnmente para promover la expansión de células madre, mientras se mantiene su estabilidad y viabilidad genómica en condiciones de cultivo. El experto conoce bien el término 'compuesto potenciador de células madre' particularmente

en el contexto de la medicina regenerativa y los procedimientos cosméticos, donde se usan células madre para generar diversos tipos de tejidos *in vitro*. Ejemplos no limitantes de compuestos potenciador de células madre incluyen eritropoyetina, células CD34-positivas, ácido retinoico y otros.

5 **[0043]** El término "célula CD34-positiva" se refiere a una célula positiva para el marcador molecular CD34, que es una glucoproteína de superficie que funciona como un factor de adhesión célula-célula. CD34 también puede mediar en la unión de células madre a matriz extracelular de médula ósea o directamente a células del estroma. CD34 también es el nombre para el gen humano que codifica la proteína. CD34 representa un marcador muy conocido para células progenitoras primitivas derivadas de sangre y médula ósea, especialmente para progenitores
10 hematopoyéticos y endoteliales. Las células CD34-positivas se pueden aislar de sangre periférica o médula ósea en un sujeto. Es particularmente ventajoso aislar las células CD34-positivas de sangre periférica o médula ósea de un paciente en el contexto donde se desea, por ejemplo, un injerto autólogo de tejido. Las células CD34-positivas son un ejemplo de un compuesto potenciador de células madre.

15 **[0044]** El término 'compuesto de la matriz extracelular', como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto capaz de proporcionar soporte estructural y bioquímico a las células en un tejido o aglomerado de células en contextos *in vivo* e *in vitro* (por ejemplo, cultivo). También se conoce ampliamente que los compuestos de la matriz extracelular promueven la adhesión celular, comunicación célula con célula y diferenciación dentro de un tejido dado o aglomerado de células en un medio de cultivo. El experto está familiarizado con el término 'compuesto
20 de la matriz extracelular' y reconoce que el término 'compuesto de la matriz extracelular' engloba una amplia variedad de compuestos útiles en el contexto del cultivo celular o de tejido. Ejemplos no limitantes de compuestos de la matriz extracelular incluyen plasma rico en plaquetas, laminina, colágeno IV, sulfato de heparina, entactina, sulfato de condroitina, y similares.

25 **[0045]** El término "factor inductor de la diferenciación", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que es capaz de inducir la diferenciación de una célula madre mesenquimatosas, tal como una célula madre de folículo piloso, en un tipo de célula diferente deseado, tal como célula neural, célula fotorreceptora, cardiomiocitos, células de músculo liso, células epiteliales, y similares. Un factor inductor de la diferenciación puede ser cualquier tipo de compuesto. Por ejemplo, un factor inductor de la diferenciación puede ser un factor de
30 crecimiento muy conocido o cualquier otro compuesto químico. Con el fin de inducir la diferenciación, se pueden usar en combinación los factores inductores de la diferenciación.

[0046] El término "factor de crecimiento", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que existe de forma natural capaz de estimular el crecimiento celular, proliferación, diferenciación celular y/o
35 maduración celular. Los factores de crecimiento existen en forma de ya sea proteínas o hormonas esteroideas. Los factores de crecimiento son importantes para regular una variedad de procesos celulares. Los factores de crecimiento normalmente actúan de moléculas de señalización entre células. Sin embargo, su capacidad para promover el crecimiento celular, proliferación, diferenciación celular y maduración celular varía entre los factores de crecimiento. Una lista no limitante de ejemplos de factores de crecimiento incluye: factor de crecimiento de
40 fibroblastos básico, adrenomedulina, angiopoyetina, factor de motilidad autocrino, proteínas morfogenéticas óseas, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento de fibroblastos, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, factor 9 de diferenciación del crecimiento, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor de crecimiento de insulina,
45 factor de crecimiento similar a la insulina, factor estimulante de la migración, miostatina, factor de crecimiento nervioso, y otras neurotrofinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante beta, factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento placentario, somatotropina bovina fetal y citocinas (por ejemplo, IL-1- cofactor para IL-3 e IL-6, IL-2- factor de crecimiento de linfocitos T, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-7).

50 **[0047]** Como se usa en el presente documento, el término "células madre de folículo piloso" puede incluir células madre epiteliales del folículo piloso, células madre de tipo mesenquimatosas del folículo piloso, células madre de melanocitos del folículo piloso y/o células madre nestina-positivas.

55 **[0048]** Los términos "células neurales y/o tejido neural" y "célula nerviosa y/o tejido nervioso", como se usan en el presente documento, se refieren a célula y/o tejido que tiene origen del principal componente de las dos partes del sistema nervioso; el cerebro y la médula espinal del sistema nervioso central (SNC), y los nervios periféricos de ramificación del sistema nervioso periférico (SNP). El término "célula y/o tejido nervioso" también se usa comúnmente como un equivalente a "células neurales y/o tejido neural" y "célula nerviosa y/o tejido nervioso". En la

presente invención, estos términos se usan indistintamente.

[0049] Los términos "autólogo", en el contexto de la presente invención, significa "derivado o transferido del mismo cuerpo del individuo", y se puede referir a órganos, tejidos, células, líquidos o proteínas de un sujeto, y que se van a administrar a o trasplantar en el mismo individuo (opcionalmente, otra parte del cuerpo). Los órganos, tejido, células o proteínas trasplantados por tal procedimiento "autólogo" se denomina un autoinjerto o autotrasplante.

[0050] El término "alógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a órganos, tejidos, células, líquidos o proteínas tomados de un sujeto donante, y que se van a administrar a o trasplantar en un sujeto receptor de la misma especie que es genéticamente no idéntico al sujeto donante. Los órganos, tejido, células, líquidos o proteínas trasplantados por tal procedimiento "alógeno" se denomina un aloinjerto o alotrasplante.

[0051] El término "foliculo piloso" se refiere a un órgano de la piel del mamífero que produce pelo. Más particularmente, el foliculo piloso está compuesto por la papila dérmica (DP), vaina dérmica (DS), vaina radicular externa (ORS), vaina radicular interna (IRS) y tallo del pelo. Las partes superior e inferior del foliculo piloso comprenden ambas células madre de foliculo piloso que son capaces de generar un nuevo pelo. Éstas se denominan 'células madre de la protuberancia' y 'células madre de la matriz', respectivamente.

[0052] El término "al menos una parte de un foliculo piloso", como se usa en el presente documento, se refiere a una parte de un foliculo piloso o un foliculo piloso entero. La al menos una parte de un foliculo piloso comprende al menos una célula madre de foliculo piloso, pero preferentemente más de una. Las células madre de foliculo piloso pueden ser o bien células madre de la protuberancia o células madre de la matriz, o ambas. Preferentemente, las células madre de foliculo piloso comprenden al menos células madre de la protuberancia o derivados de las mismas.

[0053] Los términos "fase anágena", "fase catágena" y "fase telógena" representan las tres fases del ciclo de crecimiento natural del pelo, que incluyen la fase de crecimiento, la fase transicional (también denominada fase involutiva o regresiva) y la fase de muerte (también denominada fase de reposo o quiescente), respectivamente.

[0054] El término "cultivo tridimensional" se refiere a un procedimiento de cultivo de células donde las células se implantan o siembran en una estructura artificial capaz de soportar la formación de tejido tridimensional. Estas estructuras, normalmente llamadas armazones, son críticas, tanto *ex vivo* así como *in vivo*, para sintetizar el medio *in vivo* y permitir que las células influyan en sus propios microentornos.

[0055] El término "expandir" o el término "multiplicar", como se usan en el presente documento, se refieren a la proliferación de una célula en dos células, etc. Durante el proceso de expansión o multiplicación de células madre de foliculo piloso, una célula madre de foliculo piloso se auto-renueva. La auto-renovación de una célula es la capacidad de una célula dada para pasar por numerosos ciclos de división celular, mientras se mantiene un estado no diferenciado, es decir, la célula madre de foliculo piloso sigue siendo una célula madre de foliculo piloso independientemente del número de ciclos de división celular.

COMPOSICIONES DE LA INVENCION

[0056] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición que es adecuada para generar un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado a partir de al menos una célula madre de foliculo piloso, es decir, para diferenciar dicha célula madre de foliculo piloso en un tipo de célula diferente, comprendiendo dicha composición al menos un compuesto antiapoptótico, donde dicho agente antiapoptótico es un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable, al menos un compuesto antioxidante, al menos un compuesto potenciador de células madre, al menos un compuesto de la matriz extracelular y al menos un factor inductor de la diferenciación. La composición enseñada en el presente documento puede carecer del suero bovino fetal (FBS) que se usa comúnmente en el cultivo y la diferenciación de células y es, por tanto, adecuado para el cultivo de células y tejidos que se pretende volver a aplicar dentro de o sobre el cuerpo humano.

[0057] Se conocen bien en la técnica los compuestos antiapoptóticos, compuestos antioxidantes, compuestos potenciador de células madres compuestos de la matriz extracelular y factores inductores de la diferenciación y pueden incluso estar comercialmente disponible. Se pueden usar cualesquiera de los compuestos antiapoptóticos, compuestos antioxidantes, compuestos potenciadores de células madres, compuestos de la matriz extracelular y factores inductores de la diferenciación comercialmente disponibles para la preparación de la

composición de la presente invención.

[0058] En una realización, el compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en bis(maltolato)oxovanadio (Cas N° 38213-69-3), oxovanadio, ortovanadio y derivados de los mismos. En una realización más preferida, el compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable es bis(maltolato)oxovanadio. Se puede usar cualquier concentración fisiológicamente aceptable (mg/ml) de bis(maltolato)oxovanadio en la composición de la presente invención. Sin embargo, en la presente invención se prefiere una concentración de 0,01-100 mg/ml, más preferentemente 0,1-10 mg/ml, más preferentemente 0,5-8 mg/ml, más preferentemente 0,6-6 mg/ml, más preferentemente 0,7-3 mg/ml, 0,8-2 mg/ml, más preferentemente 0,9-1,5 mg/ml, más preferentemente aproximadamente 1 mg/ml de bis(maltolato)oxovanadio. El presente inventor ha encontrado que el uso de un compuesto antiapoptótico, tal como un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable, especialmente bis(maltolato)oxovanadio, fue particularmente eficaz con respecto a otros tipos de agentes antiapoptóticos. Específicamente, se encontró que la incorporación de un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable, especialmente bis(maltolato)oxovanadio, en la composición reforzó enormemente la eficiencia de los otros componentes presentes en las composiciones de la presente invención, tales como factores de crecimiento.

[0059] En una realización, se puede usar indistintamente bis(maltolato)oxovanadio, oxovanadio y ortovanadio.

[0060] En una realización, la composición como se enseña en el presente documento puede comprender además un segundo o más agentes antiapoptóticos seleccionados del grupo que consiste en triyodotironina, estradiol, progesterona, insulina, transferrina, selenio, L-cisteína, L-leucina, adenosina trifosfato-cloruro de magnesio y extracto de tejido.

[0061] Se conocen bien en la técnica los extractos de tejido y están comercialmente disponibles. Procedimientos y protocolos para preparar extractos de tejido también se conocen bien en la técnica. Se puede usar cualquier tejido comercialmente disponible o extractos preparados internamente para preparar la composición de la invención, pero se prefiere extracto bovino de pituitaria. Puede ser particularmente ventajoso incorporar un extracto de tejido, particularmente un extracto bovino de pituitaria, en la composición de la invención con el fin de mantener las células madre de folículo piloso en un estado no diferenciado. El mantenimiento de las células madre de folículo piloso en un estado no diferenciado es importante, por ejemplo, durante las fases de cultivo y expansión (o multiplicación), de manera que las células madre de folículo piloso puedan experimentar auto-renovación, es decir, pasar a través de numerosos ciclos de división celular, mientras se mantiene un estado no diferenciado (mantienen estabilidad genética). Este proceso se realiza normalmente para aumentar la población de tallos de folículo piloso del pelo antes de usar dicha población de células madre de folículo piloso para generar un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado.

[0062] En una realización, están presentes en la composición de la invención al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más segundos o más compuestos antiapoptóticos seleccionados del grupo de: triyodotironina, estradiol, progesterona, extracto de tejido (por ejemplo, extracto bovino de pituitaria), insulina, transferrina, selenio, L-cisteína, adenosina trifosfato-cloruro de magnesio y L-leucina. Se encontró específicamente por el presente inventor que la incorporación de al menos dos, preferentemente tres, preferentemente cuatro, preferentemente cinco, preferentemente seis, preferentemente siete, preferentemente ocho, preferentemente nueve, y más preferentemente diez, era particularmente ventajoso puesto que mejoró adicionalmente la eficiencia de la composición de la invención, con respecto a una composición donde solo está presente el compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable.

[0063] En una realización, el compuesto antioxidante de la composición de la invención se selecciona del grupo de quercetina, monohidroxietilrutósido, vitamina C, mesilato de deferoxamina, vitamina E y ácido lipoico, y un derivado del mismo. Se conocen bien en la técnica los compuestos antioxidantes y están comercialmente disponibles. Se puede usar en la presente invención cualquier compuesto antioxidante comercialmente disponible. Sin embargo, en una realización, se prefiere la incorporación de un flavonoide tal como quercetina o monohidroxietilrutósido, particularmente mono-hidroxietilrutósido. Se puede usar en la composición de la presente invención cualquier concentración fisiológicamente aceptable (mg/ml) de mono-hidroxietilrutósido que tenga actividad antioxidante. Por ejemplo, la concentración puede estar en el intervalo de 0,0025-25 mg/ml, más preferentemente 0,025-2,5 mg/ml, más preferentemente 0,12-2 mg/ml, más preferentemente 0,15-1,5 mg/ml, más preferentemente 0,18-1 mg/ml, más preferentemente 0,2-0,5 mg/ml, más preferentemente 0,21-0,4 mg/ml, más preferentemente 0,23-0,3 mg/ml, más preferentemente 0,23-0,28 mg/ml, y más preferentemente es aproximadamente 0,25 mg/ml de mono-hidroxietilrutósido.

[0064] En otra realización, se incorporan en la composición de la invención al menos dos, tres, o más compuestos antioxidantes seleccionados del grupo de: quercetina, monohidroxitilrutósido, vitamina C, mesilato de deferoxamina, vitamina E, y ácido lipoico. Se encontró por el inventor que la presencia de más de dos compuestos
5 antioxidantes, preferentemente tres o más compuestos antioxidantes, mejoró adicionalmente la eficacia de la composición de la invención, con respecto a una composición donde solo está presente un compuesto antioxidante.

[0065] En una realización, el al menos un compuesto potenciador de células madre de la composición de la invención se selecciona del grupo de eritropoyetina, célula CD34-positiva y ácido retinoico. En una realización, el
10 potenciador de células madre se selecciona del grupo que consiste en eritropoyetina y célula CD34-positiva. Se encontró particularmente que la eritropoyetina era muy eficaz.

[0066] En otra realización preferida, el compuesto potenciador de células madre es una célula CD34-positiva. Se puede usar en la presente invención cualquier cantidad fisiológicamente aceptable (células/ml) de células CD34-
15 positivas, pero se prefiere una cantidad de aproximadamente 1×10^1 - 1×10^5 células/ml, más preferentemente aproximadamente 1×10^2 - 1×10^4 células/ml, más preferentemente aproximadamente 5×10^2 - 1×10^4 células/ml, más preferentemente aproximadamente 5×10^2 - $0,5 \times 10^4$ células/ml, más preferentemente aproximadamente 6×10^2 - $0,4 \times 10^4$ células/ml, más preferentemente aproximadamente 7×10^2 - $0,3 \times 10^4$ células/ml, más preferentemente aproximadamente 8×10^2 - $0,2 \times 10^4$ células/ml, más preferentemente aproximadamente 9×10^2 - $0,15 \times 10^4$ células/ml,
20 más preferentemente aproximadamente 1×10^3 células CD34-positivas/ml. En una realización, la célula CD34-positiva es obtenible o se obtiene de una línea celular CD34-positiva. Se conocen en la técnica líneas celulares CD34-positivas y están comercialmente disponibles, por ejemplo, KG-1a, KG-1 y NIH3T3. En una realización, la célula CD34-positiva es obtenible o se obtiene de una línea celular CD34-positiva humana, que también está comercialmente disponible, tal como KG-1a, KG-1 y NIH3T3. Sin embargo, en una realización preferida adicional, la
25 célula CD34-positiva deriva de la sangre periférica o de la médula ósea de un sujeto donante. Ejemplos de un sujeto donante incluyen un sujeto no humano mamífero o un sujeto humano. En una realización preferida adicional, el sujeto donante es un sujeto humano. Se conocen en la técnica procedimientos de aislamiento e identificación de células CD34-positivas de la sangre periférica o médula ósea. Por ejemplo, se puede usar procedimientos inmunohistoquímicos y kits que comprenden anticuerpos dirigidos contra el antígeno CD34 para identificar células
30 CD34-positivas.

[0067] En una realización más preferida, el compuesto potenciador de células madre es eritropoyetina. Se puede usar en la presente invención cualquier cantidad fisiológicamente aceptable de eritropoyetina, pero se usa una cantidad de aproximadamente 0,1 unidades a 10 unidades de eritropoyetina/ml, preferentemente se usan
35 aproximadamente 0,3 unidades a 8 unidades de eritropoyetina/ml, preferentemente se usan aproximadamente 0,5 unidades a 6 unidades de eritropoyetina/ml, se usan aproximadamente 0,7 unidades a 4 unidades de eritropoyetina/ml, se usan aproximadamente 0,9 unidades a 2 unidades de eritropoyetina/ml, se usan aproximadamente 0,95 unidades a 1,5 unidades de eritropoyetina/ml, se usa más preferentemente aproximadamente 1 unidad de eritropoyetina/ml. En una realización, la eritropoyetina se puede obtener de una
40 fuente comercial. En una realización preferida, la eritropoyetina se puede obtener de un sujeto donante, por ejemplo de la circulación sanguínea o de médula ósea de un sujeto donante. Ejemplos de un sujeto donante incluyen un sujeto no humano mamífero o un sujeto humano. En una realización preferida adicional, el sujeto donante es un sujeto humano. Se conocen en la técnica procedimientos de obtención de eritropoyetina de la sangre periférica o médula ósea. El experto en la materia conoce bien el término "Unidad" (abreviado como "U") como una unidad de
45 medida para la cantidad de eritropoyetina. Las cantidades de eritropoyetina se expresan en unidades (U) en vez de en gramos o moles, debido a que la eritropoyetina nativa y la eritropoyetina humana recombinante son mezclas de isoformas con bioactividades diferentes. En la presente invención, una unidad se define como la cantidad de eritropoyetina que se requiere para producir incorporación equivalente de $^3\text{[H]}$ -timidina en células del bazo de ratones tratados con fenilhidracina con respecto a la expresada de 1 unidad del patrón de referencia de
50 eritropoyetina de la OMS (2ª Primera preparación de referencia internacional).

[0068] En una realización, al menos dos, tres o más compuestos potenciadores de células madre seleccionados del grupo de eritropoyetina, célula CD34-positiva y ácido retinoico, están presentes en la composición de la invención. Se encontró por el presente inventor que la presencia de al menos dos compuestos potenciadores
55 de células madres, preferentemente la presencia de tres compuestos potenciadores de células madres, seleccionados del grupo de: eritropoyetina, célula CD34-positiva y ácido retinoico, condujeron a un aumento en la eficiencia de la composición de la invención, con respecto a una composición donde solo está presente un compuesto potenciador de células madre.

- [0069]** En una realización adicional, la composición de la invención puede comprender al menos un agente desgranulante. En una realización, el agente desgranulante es el compuesto 48/80. Se conocen en la técnica los agentes desgranulantes, tales como el compuesto 48/80, y están comercialmente disponibles. En otra realización, la composición de la invención también puede comprender al menos una sal inorgánica. Dicha sal inorgánica puede ayudar a optimizar la acción del agente desgranulante. Se conocen en la técnica sales inorgánicas y también están comercialmente disponibles. En una realización, la sal inorgánica es CaCl_2 . Puede ser particularmente ventajoso incorporar al menos un agente desgranulante tal como el compuesto 48/80 y al menos una sal inorgánica tal como CaCl_2 en una composición de la invención que comprende una célula CD34-positiva.
- 10 **[0070]** En una realización, el al menos un compuesto de la matriz extracelular se selecciona del grupo de: plasma rico en plaquetas, laminina, colágeno IV, sulfato de heparina, entactina y sulfato de condroitina. El término "compuesto de la matriz extracelular" es un término muy conocido para aquellos expertos en la materia. Ejemplos no limitantes de compuestos de la matriz extracelular son colágeno, laminina, elastina, fibronectina, y similares, que están ampliamente comercialmente disponibles. También se conocen en la técnica sustitutos de los mismos y están
15 comercialmente disponibles. También se conocen en la técnica procedimientos y protocolos para preparar los compuestos de la matriz extracelular. Se puede usar en la composición de la invención cualquier compuesto extracelular interno o comercialmente disponible. En una realización preferida, el compuesto de la matriz extracelular es plasma rico en plaquetas. Se puede usar en la presente invención cualquier concentración fisiológicamente aceptable (ml/ml) de plasma rico en plaquetas, pero se prefiere una concentración en el intervalo de
20 aproximadamente 0.0005-5 ml/ml, más preferentemente aproximadamente 0,005-0,5 ml/ml, más preferentemente aproximadamente 0,01-0,25 ml/ml, más preferentemente aproximadamente 0,02-0,15 ml/ml, más preferentemente aproximadamente 0,03-0,10 ml/ml, más preferentemente aproximadamente 0,04-0,08 ml/ml, más preferentemente aproximadamente 0,045-0,06 ml/ml, más preferentemente aproximadamente 0,05 ml/ml de plasma rico en plaquetas. En una realización, el plasma rico en plaquetas deriva de la sangre periférica de un sujeto donante,
25 preferentemente un sujeto humano. Se conocen en la técnica protocolos y procedimientos de obtención de plasma rico en plaquetas de la sangre de un sujeto.
- [0071]** En una realización, están presentes en la composición de la invención al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más, compuestos de la matriz extracelular seleccionados del grupo de: plasma rico en plaquetas,
30 laminina, colágeno IV, sulfato de heparina, entactina y sulfato de condroitina. Se encontró por el presente inventor que la incorporación de al menos dos, preferentemente tres, preferentemente cuatro, preferentemente cinco, más preferentemente seis compuestos de la matriz extracelular en la composición de la invención, condujo a un aumento en la eficacia de la composición de la invención, con respecto a la composición donde solo está presente un compuesto de la matriz extracelular.
35
- [0072]** En otra realización, la composición de la invención puede comprender opcionalmente además uno o más componentes seleccionados del grupo de: albúmina, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, oligoelementos, constituyentes orgánicos, sales inorgánicas, complemento de crecimiento y antibióticos. Puede ser ventajoso añadir uno o más de dichos componentes para promover adicionalmente el crecimiento y la proliferación
40 de células madre de folículo piloso, mientras que se elude la contaminación bacteriana en el medio de cultivo.
- [0073]** En una realización, la composición enseñada en el presente documento no comprende suero bovino fetal (también conocidos como suero de ternera fetal), o cualquier suero animal, que incluye suero humano, a menos que el suero sea autólogo para el sujeto al que se trasplanta un tipo de célula deseado o un tipo de tejido deseado.
45 Por ejemplo, el tipo de célula deseado generado usando la composición de la invención se puede trasplantar en un sujeto, que también puede haber proporcionado la célula madre de folículo piloso.
- [0074]** En una realización altamente adecuada, la composición de la invención comprende bis(maltolato)oxovanadio en una concentración en el intervalo de 0,01-100 mg/ml, más preferentemente 0,1-10
50 mg/ml, más preferentemente 0,5-8 mg/ml, más preferentemente 0,6-6 mg/ml, más preferentemente 0,7-3 mg/ml, 0,8-2 mg/ml, más preferentemente 0,9-1,5 mg/ml, más preferentemente aproximadamente 1 mg/ml; eritropoyetina en una cantidad de aproximadamente 0,1 unidades a 10 unidades/ml, preferentemente aproximadamente 0,3 unidades a 8 unidades/ml, más preferentemente aproximadamente 0,5 unidades a 6 unidades/ml, incluso más preferentemente aproximadamente 0,7 unidades a 4 unidades/ml, aún más preferentemente aproximadamente 0,9
55 unidades a 2 unidades/ml, incluso más preferentemente aproximadamente 0,95 unidades a 1,5 unidades de eritropoyetina/ml; al menos un compuesto antioxidante, seleccionado preferentemente del grupo de quercetina, monohidroxietilrutósido, vitamina C, mesilato de deferoxamina, vitamina E y ácido lipoico, o cualquier combinación de los mismos, por ejemplo, una combinación de monohidroxietilrutósido, vitamina E y ácido lipoico; al menos un compuesto de la matriz extracelular, por ejemplo, plasma rico en plaquetas; y al menos un factor inductor de la

diferenciación.

[0075] El factor inductor de la diferenciación se puede seleccionar del grupo que consiste en: factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante y factor de crecimiento epitelial; 5-azacitidina; activina A; taurina; y cualquier combinación de las mismas. Otros ejemplos no limitantes de factores de crecimiento de los que se puede seleccionar el factor de crecimiento incluyen: adrenomedulina, angiopoyetina, factor de motilidad autocrino, proteínas morfogenéticas óseas, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico derivado de la línea celular glial, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, factor 9 de diferenciación del crecimiento, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento derivado de hepatoma, factor de crecimiento similar a la insulina, factor estimulante de la migración, miostatina, neurotrofinas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante beta, factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento endotelial vascular, factor de crecimiento placentario, somatotropina bovina fetal y citocinas (por ejemplo IL-1- cofactor para IL-3 e IL-6, IL-2- factor de crecimiento de linfocitos T, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-7). Se puede usar en la presente invención cualquier concentración fisiológicamente aceptable (ng/ml) de factor de crecimiento, pero se prefiere una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,01-100000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 0,1-10000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 1-1000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 10-500 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 50-400 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 70-300 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 80-200 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 90-150 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 95-125 ng/ml de factor de crecimiento.

[0076] En una realización, el factor de crecimiento se puede seleccionar de uno o más de factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento similar a la insulina y factor de crecimiento nervioso, y el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado es célula neural y/o tejido neural.

[0077] En una realización, los factores inductores de la diferenciación usados son los factores de crecimiento factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), y el tipo de célula deseado es células de un linaje endotelial (Xu et al. Mol Med Rep. 2014, vol. 9:204-210). Se puede usar VEGF en una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1-10.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 1-1.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 10-500 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 25-200 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 30-100 ng/ml. Se puede usar bFGF en una concentración de aproximadamente 0,01-10.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 0,1-1.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 0,5-200 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 1-100 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 5-50 ng/ml.

[0078] En otra realización, los factores inductores de la diferenciación usados son factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) y factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), y el tipo de célula deseado es células de músculo liso contráctil (Xu et al. Mol Med Rep. 2013, vol. 8:1715-1721). Se puede emplear TGF- β 1 en una concentración de aproximadamente 0,01-10.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 0,1-1.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 0,5-200 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 1-100 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 2-50 ng/ml. Se puede emplear PDGF-BB en una concentración de aproximadamente 0,01-10.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 0,1-1.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 0,5-200 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 1-100 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 2-50 ng/ml.

[0079] En una realización, los factores inductores de la diferenciación se seleccionan de taurina, activina A y factor de crecimiento epidérmico (EGF), o una combinación de los mismos, y el tipo de célula deseado es una célula fotorreceptora (células que expresan los marcadores específicos de fotorreceptores rodopsina, opsina y recoverina), y/o el tipo de tejido es tejido retiniano, por ejemplo, tejido del epitelio pigmentario de la retina (Kicic et al. 2003. J. Neurosci. Vol. 23:7742-7749). Las células obtenidas se pueden trasplantar en el ojo para contrarrestar las degeneraciones oculares, tales como degeneración macular, por ejemplo, degeneración macular senil. Se puede emplear taurina en una concentración en el intervalo de 0,1-1.000 μ M, preferentemente 1-500 μ M, más preferentemente 5-100 μ M, lo más preferentemente 25-50 μ M. Se puede emplear activina A en una concentración en el intervalo de 0,1-10.000 ng/ml, preferentemente 1-1.000 ng/ml, más preferentemente 5-500 ng/ml, aún más preferentemente 10-300 ng/ml, incluso más preferentemente 50-200 ng/ml. Se puede usar cualquier concentración fisiológicamente aceptable (ng/ml) de factor de crecimiento epidérmico, pero se prefiere una concentración en el intervalo de aproximadamente 0,1-100.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 1-10.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 10-1.000 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 50-500 ng/ml, más

preferentemente aproximadamente 60-400 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 70-300 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 80-200 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 90-150 ng/ml, más preferentemente aproximadamente 95-125 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico.

5 **[0080]** En una realización, el factor inductor de la diferenciación es 5-azacitidina y el tipo de célula deseado es un cardiomiocito (Potdar y Prasannan. 2013. ISRN Stem cell. Artículo ID687282). La 5-azacitidina se puede emplear en una concentración en el intervalo de 0,1-1.000 μM , preferentemente 1-500 μM , más preferentemente 5-100 μM , lo más preferentemente 5-50 μM .

10 **[0081]** En una realización, el factor de crecimiento es un factor de crecimiento epidérmico y el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado se selecciona del grupo que consiste en célula epidérmica y/o tejido epidérmico, célula dérmica y/o tejido dérmico, célula de vaso sanguíneo y/o tejido de vaso sanguíneo, y célula ósea y/o tejido óseo. El factor de crecimiento epidérmico se puede seleccionar del grupo que consiste en: factor de crecimiento de tipo crecimiento epidérmico de unión a heparina, epiregulina, epigen, betacelulina, neuregulina-1, neuregulina-2,
15 neuregulina-3 y neuregulina-4.

[0082] En una realización, el factor de crecimiento es factor de crecimiento transformante, y el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado se selecciona del grupo que consiste en célula de cartílago y/o tejido de cartílago, célula de válvula cardíaca y/o tejido de válvula cardíaca, y célula de músculo esquelético y/o tejido de músculo esquelético.
20 El factor de crecimiento transformante se puede seleccionar del grupo que consiste en: factor de crecimiento transformante alfa y factor de crecimiento transformante beta.

[0083] En una realización, el factor de crecimiento es factor de crecimiento epitelial, y el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado es célula de queratinocito y/o tejido de queratinocito.
25

[0084] En una realización, la composición de la presente invención comprende además un medio de crecimiento sin suero. Se conocen bien en la técnica medios de crecimiento sin suero y están fácilmente comercialmente disponibles. El experto sabrá cómo seleccionar un medio de crecimiento sin suero apropiado. En la realización preferida, el medio de crecimiento sin suero comprende además al menos un componente seleccionado del grupo de: albúmina, cloruro sódico, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, fosfato de sodio, cloruro de calcio, glucosa, bicarbonato sódico, lactato de sodio, piruvato de sodio, albúmina de suero humano e insulina.
30

Procedimiento *in vivo* de generación de un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado a partir de al menos una célula madre de folículo piloso.
35

PROCEDIMIENTO DE LA INVENCION

[0085] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vivo* mejorado de generación de un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado a partir de al menos una célula madre de folículo piloso, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
40

(a) proporcionar al menos una célula madre de folículo piloso;

(b) cultivar la al menos una célula madre de folículo piloso en un medio de crecimiento sin suero para obtener una población de células madre de folículo piloso;

45 (c) poner en contacto la población de células madre de folículo piloso de la etapa (b) con una composición como se enseña en el presente documento y permitir que dicha población de células madre de folículo piloso se diferencie en el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado en condiciones favorables para la diferenciación; y

(d) recoger el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado.

50 **[0086]** En una realización, la al menos una célula madre de folículo piloso de la etapa (a) se obtiene de al menos una parte de un folículo piloso en la fase anágena. En otra realización, la al menos una parte de un folículo piloso en la fase anágena se ha obtenido arrancando el pelo de un área donante de un sujeto. En una realización preferida, el sujeto donante es un ser humano. Sin embargo, no es esencial que la célula madre de folículo piloso de la etapa (a) sea de origen humano.
55

[0087] En la etapa (a), la provisión de al menos una parte de un folículo piloso en la fase anágena se puede realizar por cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo arrancando uno o más pelos del donante de un sujeto donante, tal como el cuero cabelludo de un sujeto donante, y luego seleccionar uno o más pelos del donante en la fase anágena. El seleccionar un pelo del donante en la fase anágena se puede realizar por un experto

habitual en la materia. Es muy conocido en la técnica que un pelo en la fase anágena muestra características morfológicas e histológicas específicas que lo distinguen de un pelo en otra fase del ciclo de crecimiento, tal como la fase catágena o la fase telógena.

- 5 **[0088]** El pelo se puede arrancar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplos, el pelo se puede arrancar usando los dedos o se puede usar un instrumento de arrancado (por ejemplo, pinzas). En una realización, el pelo del donante se retira usando un instrumento de arrancado tal como una aguja de recogida hueca, como se describe en la solicitud internacional publicada WO2005077285.
- 10 **[0089]** En una realización, la al menos una parte de un folículo piloso se puede poner en contacto con un medio que comprende colagenasa IV, de tal manera que al menos una célula madre de folículo piloso se disocie enzimáticamente de la al menos una parte de un folículo piloso en la fase anágena. Puede ser particularmente ventajoso realizar esta etapa en una situación donde la al menos una célula madre de folículo piloso de la etapa (a) está todavía unido o incorporado dentro del folículo piloso o parte de un folículo piloso. Se conoce en la técnica que
 15 las células madre de folículo piloso se pueden disociar enzimáticamente de sus folículo piloso respectivo usando enzimas tales como colagenasas. Las colagenasas, particularmente la colagenasa IV, se conocen bien en la técnica y están comercialmente disponibles. También se conocen protocolos y procedimientos de disociación de células madre de folículo piloso usando colagenasas (por ejemplo, colagenasa IV) u otras enzimas y se usan rutinariamente en la técnica.
- 20 **[0090]** En la etapa (a), en ciertos casos, por ejemplo cuando se obtiene una población mixta de células de folículo piloso del folículo piloso o parte de un folículo piloso, puede ser ventajoso aislar y purificar las células madre de folículo piloso de la mezcla, antes de realizar la etapa (b). Se conocen en la técnica procedimientos y protocolos de aislamiento, purificación, identificación y separación de células madre de folículo piloso.
- 25 **[0091]** En una realización, la al menos una célula madre de folículo piloso de la etapa (a) se puede cultivar y expandir en un medio de crecimiento sin suero de la etapa (b) durante al menos dos semanas, por ejemplo, al menos 3 semanas. Se conocen en la técnica medios de crecimiento sin suero y están comercialmente disponibles. También se conocen en la técnica protocolos y procedimientos de preparación de medios de crecimiento sin suero.
 30 Se puede usar cualquier medio de crecimiento sin suero en el procedimiento *in vitro* de la invención. En una realización preferida, el medio de crecimiento sin suero de la etapa (b) se complementa además con al menos un extracto de tejido, preferentemente un extracto bovino de pituitaria. Sin desear quedar ligado a teoría, se supone que la incorporación de un extracto bovino de pituitaria bloquea activamente que las células madre de folículo piloso experimenten diferenciación durante la fase de cultivo y expansión de la etapa (b). En una realización, la etapa (b)
 35 se puede repetir durante al menos dos semanas más, preferentemente al menos 3 semanas, con el fin de obtener una expansión incluso mayor de la población de células madre de folículo piloso.
- [0092]** En la etapa (b), la al menos una célula madre de folículo piloso de la etapa (a) se cultiva de tal manera que se obtiene una población de células madre de folículo piloso.
- 40 **[0093]** En la etapa (b), en ciertos casos, por ejemplo en caso de aparición de muerte celular durante el periodo de cultivo, puede ser ventajoso retirar la célula muerta del entorno de cultivo. Se conocen en la técnica protocolos y procedimientos de retirada de las células muertas de un entorno de cultivo. Por ejemplo, se puede usar un procedimiento de centrifugación en gradiente para retirar las células muertas del medio de cultivo.
- 45 **[0094]** En la etapa (b), puede ser ventajoso reponer el medio de cultivo de la etapa regularmente, preferentemente diariamente (es decir, cada 24 horas).
- [0095]** En la etapa (b), también puede ser particularmente ventajoso cultivar la al menos una célula madre de
 50 folículo piloso de la etapa (a) en el contexto de un medio de cultivo tridimensional. Se conoce en la técnica que los sistemas de cultivo celular tridimensional permiten que ocurran diversos tipos de interacciones entre los diferentes tipos de células presentes en el cultivo de un modo que imita lo que ocurre en un entorno natural. También se conocen bien en la técnica procedimientos y protocolos para realizar el cultivo celular tridimensional.
- 55 **[0096]** En una realización, el medio de crecimiento sin suero de la etapa (b) puede comprender además uno o más componentes seleccionados del grupo de albúmina, aminoácidos esenciales y no esenciales, vitaminas, oligoelementos, constituyentes orgánicos, sales inorgánicas, complemento de crecimiento, hormonas, antibióticos y extractos de tejido. La adición de uno o más de dichos componentes puede ser ventajosa para promover adicionalmente la proliferación, expansión y crecimiento de las células madre de folículo piloso mientras que se

previene la contaminación bacteriana o eliminación de otros patógenos en el medio de cultivo.

[0097] En la etapa (c), la población de células madre de folículo piloso de la etapa (b) se pone en contacto con una composición como se enseña en el presente documento; y se deja que dicha población de células madre de folículo piloso se diferencie en el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado en condiciones favorables para la diferenciación.

[0098] En una realización, la población de células madre de folículo piloso de la etapa (b) se pone en contacto con la composición de la etapa (c) durante al menos dos semanas, por ejemplo, al menos tres semanas, al menos cuatro semanas, al menos cinco semanas, al menos seis semanas, y similares. En una realización, el periodo de tiempo durante el que la población de células madre de folículo piloso de la etapa (b) se pone en contacto con el medio de la etapa (c) varía dependiendo del tipo de célula y/o tipo de tejido deseado.

[0099] En otra realización, el tipo de célula deseado de la etapa (d) se selecciona del grupo que consiste en: célula neural, célula fotorreceptora tal como célula de epitelio pigmentario de la retina y bastones y conos, célula cardíaca tal como célula de cardiomiocito e intersticiales, célula dental tal como odontoblasto y otras células de la pulpa dental, célula epitelial, célula de queratinocito, célula de fibroblasto, célula grasa, glóbulo sanguíneo, célula inmunitaria, célula muscular, célula dérmica, célula madre de folículo piloso, célula ósea tal como osteoblasto, osteocito, osteoclasto, y célula de cartílago tal como condrocito. En una realización adicional, el tipo de tejido deseado de la etapa (d) se selecciona del grupo de: tejido neural, tejido ocular, tejido cardíaco, tejido dental, tejido epitelial, tejido de queratinocito, tejido conjuntivo, tejido de fibroblasto, tejido adiposo, tejido muscular, tejido dérmico, tejido piloso, tejido óseo y tejido de cartílago.

[0100] En una realización preferida, la al menos una célula madre de folículo piloso de la etapa (a) deriva de un sujeto, y la composición de la etapa (c) comprende al menos una célula CD34-positiva y/o plasma rico en plaquetas derivado de dicho sujeto, y donde el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado de la etapa (d) se introduce en una región receptora en dicho sujeto. En una realización más preferida, la composición de la etapa (c) comprende eritropoyetina y/o plasma rico en plaquetas derivado de dicho sujeto, y donde el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado de la etapa (d) se introduce en una región receptora en dicho sujeto.

[0101] Puede ser particularmente ventajoso que la al menos una célula madre de folículo piloso de la etapa (a), así como uno o más componentes de la composición de la etapa (c), usados para generar un tipo de célula deseado y/o tejido, deriven del sujeto que recibirá dicho tipo de célula y/o tipo de tejido deseado recién generado. Esto es especialmente ventajoso en el contexto donde se quiera una célula autóloga y/o trasplante de tejido en un sujeto. En general, dicho procedimiento asegura que el trasplante o injerto de célula (autóloga) y/o tejido será completamente biológicamente compatible con el sujeto receptor sin la aparición de complicaciones relacionadas con el rechazo inmunitario y/o la infección en dicho sujeto.

[0102] En una realización, las etapas (a), (b), (c), y (d) se realizan en condiciones estériles. Se conocen en la técnica protocolos y procedimientos de manipulación, aislamiento, identificación, purificación, cultivo, mantenimiento, fecundación y recogida de células, que incluyen células madre de folículo piloso. Puede ser particularmente ventajoso realizar las etapas (a), (b) (c), y (d) en condiciones estériles en el contexto donde el nuevo tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenido en la etapa (d) se usa en procedimientos cosméticos en un sujeto, para evitar complicaciones relacionadas con el rechazo inmunitario y/o la infección debido a la presencia de patógenos u otros agentes capaces de causar una infección o rechazo inmunitario.

USOS ADECUADOS DEL PROCEDIMIENTO Y COMPOSICIÓN DE LA INVENCION

[0103] En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenible u obtenido por el procedimiento *in vitro* de generación de un nuevo tipo de célula y/o tipo de tejido a partir de al menos una célula madre de folículo piloso, como se describe en el presente documento, para un fin cosmético y/o terapéutico en un sujeto receptor. Por ejemplo, en una realización, el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenible u obtenido por el procedimiento *in vitro* de la presente invención se usa para la reparación cosmética o terapéutica de tejido y/o cicatrización cosmética o terapéutica en un sujeto, por ejemplo sujetos que experimentan pérdida de tejido (por ejemplo, piel, grasa, músculo, tendón, etc.) debido a daño a célula y/o tejido causado por una herida, una quemadura, un desgarro, una cicatriz, acné, arrugas, degeneración, enfermedades y/o envejecimiento. En una realización adicional, el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenible u obtenido por el procedimiento *in vitro* de la presente invención se usa para el rejuvenecimiento cosmético facial y corporal. Por ejemplo, el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenible u obtenido por el procedimiento *in vitro* de la presente

invención se puede usar para remodelar cosméticamente reforma una cierta parte de la cara y/o cuerpo de un sujeto, y/o para modificar cosméticamente (por ejemplo, aumentar) el volumen de una cierta parte de la cara y/o cuerpo de un sujeto, y/o para alterar cosméticamente la textura de una cierta parte de la cara y/o cuerpo de un sujeto.

5

[0104] En una realización, el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenible u obtenido por el procedimiento *in vitro* de generación de un nuevo tipo de célula y/o tipo de tejido a partir de al menos una célula madre de folículo piloso, como se describe en el presente documento, se usa para fines terapéuticos, por ejemplo medicina regenerativa, en un sujeto receptor en necesidad de la misma. En una realización, el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado obtenible u obtenido por el procedimiento *in vitro* de la presente invención se puede usar para reparar, regenerar o sustituir tejidos dañados u órganos, así como tejidos u órganos perdidos, que ocurren como resultado de degeneración y/o necrosis y/o apoptosis causada por el envejecimiento, enfermedades, quemaduras, accidentes, lesiones, cortes, extirpaciones y similares.

10

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA RELACIONADA CON LA INVENCION

[0105] La Figura 1 muestra el efecto de los compuestos de vanadio fisiológicamente aceptables oxovanadio (OVAN) y bis(maltolato) oxovanadio (BMOV) sobre la proliferación de queratinocitos. La proliferación de queratinocitos se expresa como el número de células contadas por cantidad del medio de cultivo (es decir, número de células x10E4/ml). Los resultados revelan una potenciada proliferación de queratinocitos tras el tratamiento con una composición que comprende un suero de crecimiento de medio básico (SFK) complementado con 1 mg/ml de OVAN o 1 mg/ml de BMOV con respecto a la situación de control (es decir, medio de crecimiento básico (SFK) que carece de un compuesto de vanadio). Obsérvese que el tratamiento con BMOV está asociado con un mayor número de células proliferadas con respecto al tratamiento con OVAN.

20

25

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Conjunto de células madre de folículo piloso

30

[0106] Se obtuvieron células madre de folículo piloso de pelos arrancados en la fase anágena, que se obtuvieron de un sujeto donante, usando un instrumento de arrancado tal como una aguja de recogida hueca. Los pelos arrancados se inspeccionaron bajo un microscopio. Se desecharon los pelos arrancados que no presentaban las características de un pelo en la fase anágena.

35

Ejemplo 2. Pretratamiento de células madre de folículo piloso

[0107] Se sumergieron los pelos arrancados en la fase anágena en 1 % de colagenasa tipo IV durante 2 horas a 37 °C con el fin de disociar enzimáticamente las células madre de folículo piloso del folículo piloso. Entonces se aclararon varias veces las células madre de folículo piloso, y se resuspendieron en medio de cultivo.

40

Ejemplo 3. Recogida y cultivo de células CD34-positivas

[0108] Las células CD34-positivas actúan de "fibrocitos circulantes" y su función depende del entorno. Por ejemplo, en la cicatrización, las células CD34-positivas se concentran alrededor del tejido dañado. En el contexto de la generación de tejido, las células CD34-positivas actúan de potenciador de células madre. Específicamente, cuando las células madre de folículo piloso se cultivan junto con células CD34-positivas, las células madre de folículo piloso son capaces de proliferar sin complemento. Se obtuvieron células CD34-positivas de la circulación periférica de un sujeto donante. Se aislaron células CD34-positivas de la sangre usando un kit de separación de células MACS (Miltenyl Biotec). Entonces se aclararon varias veces las células CD34-positivas aisladas, se resuspendieron en el medio de cultivo (RPMI 1640, GIBCO, Invitrogen) que contenía suero autólogo y se cultivaron en el mismo medio durante un periodo de 8 semanas.

45

50

Ejemplo 4. Preparación de medio de cultivo

55

[0109] El medio de cultivo consistió en un medio de crecimiento estéril sin suero (medio de crecimiento sin suero definido (queratinocitos), comprado de Gibco, EE.UU.) que se preparó nuevo el día del experimento, según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 5. Preparación de la composición para generar un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado

[0110] Se preparó nueva la composición para generar un tipo de célula y/o tejido deseado añadiendo los siguientes componentes al medio de crecimiento sin suero descrito en el Ejemplo 4:

- 5 • 1 mg/ml de bis(maltolato)oxovanadio (BMOV)
- 0,25 mg/ml de mono-hidroxietilrutósido (mono-HER)
- 0,25 mg/ml de succinato de ácido de D-tocoferol/a-tocoferol (vitamina E)
- 0,1 mg/ml de ácido lipoico
- 0,1 µmol/ml de adenosina trifosfato-cloruro de magnesio
- 10 • 15 mg/ml de mesilato de deferoxamina
- 1 x 10³ células/ml de células CD34-positivas
- 0,05 ml/ml de plasma rico en plaquetas
- 1 unidad/ml de eritropoyetina
- Factor inductor de la diferenciación específico de tipo de célula y/o tipo de tejido: dependiendo del tipo de célula y/o
- 15 tipo de tejido deseado, se añade un aditivo específico. Por ejemplo, para generar célula y/o tejido de queratinocito, se añade un factor de crecimiento epitelial (véase el Ejemplo 6). Para generar célula y/o tejido neural, se añade un factor de crecimiento neural (véase el Ejemplo 7).

Ejemplo 6. Generación de célula y/o tejido de queratinocito

20 **[0111]** Se disociaron enzimáticamente células madre de folículo piloso del tejido de folículo piloso obtenido de 10 pelos arrancados de un sujeto donante usando colagenasa IV (Ejemplo 2). Se cultivaron y se expandieron las células madre de folículo piloso durante 3 semanas en un sistema de cultivo tridimensional en el medio de crecimiento estéril sin suero del Ejemplo 4. Posteriormente, se cultivó la población de células madre de folículo

25 piloso en la composición del Ejemplo 5 que comprendía factor de crecimiento epidérmico (100 ng/ml) como el factor de crecimiento durante una duración de 6 semanas. Durante este periodo, se repuso diariamente la composición que comprende el factor de crecimiento epidérmico. Al final del periodo de cultivo, se recogieron las células de queratinocitos y se sometieron a procedimientos inmunohistológicos usando anticuerpos dirigidos contra marcadores de queratinocitos, es decir, citoqueratinas. Las citoqueratinas 1, 10 y 11 son marcadores comúnmente usados de

30 diferenciación de queratinocitos y se encuentran exclusivamente en las células intermedias y en las células granulares en el infundíbulo de la vaina radicular externa (ORS) de los folículos pilosos anágenos humanos. La citoqueratina 19 es un marcador de células madre no diferenciadas, y se encuentra en las células más externas de ORS en el istmo y en algunas células de la ORS inferior. Se usan las citoqueratinas 1, 10, 11 y 19 como marcadores fiables de queratinocitos.

35 **[0112]** Los resultados muestran que las células y/o tejidos de queratinocitos recién producidos dieron positivo para los citoqueratinas 1, 10, 11 y 19, demostrándose así que las células y/o tejidos de queratinocitos se pueden generar a partir de células madre de folículo piloso usando el procedimiento y composición de la presente invención.

40 **Ejemplo 7. Generación de célula y/o tejido nervioso**

[0113] Se disociaron enzimáticamente células madre de folículo piloso del tejido de folículo piloso obtenido de 10 pelos arrancados de un sujeto donante usando colagenasa IV (Ejemplo 2). Se cultivaron y se expandieron las células madre de folículo piloso durante 3 semanas en un sistema de cultivo tridimensional en el medio de

45 crecimiento estéril sin suero del Ejemplo 4. Posteriormente, se cultivó la población de células madre de folículo piloso en la composición del Ejemplo 5 que comprendía factor de crecimiento epidérmico (100 ng/ml) como el factor de crecimiento durante una duración de 6 semanas. Durante este periodo, se repuso diariamente la composición que comprende el factor de crecimiento epidérmico. Al final del periodo de cultivo, se recogieron las células nerviosas. Al final del periodo de cultivo, se recogieron las células y/o tejidos nerviosos y se sometieron a

50 procedimientos inmunohistológicos usando anticuerpos dirigidos contra marcadores neurales, es decir, nestina. Otra indicación de un destino neural es la ausencia del marcador queratina 15. Por tanto, se identificaron de forma fiable como células neurales y/o tejidos células y/o tejidos positivos para nestina, pero negativos para queratina 15.

[0114] Los resultados muestran que las células y/o tejidos nerviosos recién producidos dieron positivo para nestina y negativo para queratina 15, demostrándose así que las células nerviosas y/o tejidos se pueden generar a partir de células madre de folículo piloso usando el procedimiento y composición de la presente invención.

Ejemplo 8: Efecto de los compuestos de vanadio sobre la proliferación de queratinocitos.

[0115] Procedimiento: Se transfirieron folículos pilosos a una placa de cultivo de 24 pocillos que contenía dSFK con 500 mg/ml de penicilina (Life Technologies B.V. Breda, Países Bajos) y 0,25 µg/ml de estreptomicina (Life Technologies B.V. Breda, Países Bajos), y se dispusieron durante 14 días en un medio de cultivo a 31 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5 % de CO₂. Se usaron tres medios de cultivo diferentes:

5

- Grupo de tratamiento oxovanadio (OVAN): El medio de cultivo es una composición que comprende un suero de crecimiento básico de SFK (comprado del proveedor SFK, Enschede, Países Bajos) complementado con 1 mg/ml de OVAN.

10 - Grupo de tratamiento bis(maltolato)oxovanadio (BMOV): El medio de cultivo es una composición que comprende un suero de crecimiento básico de SFK (comprado del proveedor SFK, Enschede, Países Bajos) complementado con 1 mg/ml de BMOV.

- Grupo de control: La situación de control consiste en una composición que comprende el suero de crecimiento básico SFK pero sin los compuestos de vanadio (es decir, OVAN o BMOV).

15 **[0116]** Se retiraron cuidadosamente cada tres días los medios de cultivo respectivos y se sustituyeron por medios de cultivo nuevos. Las células permanecieron unidas a folículos pilosos durante este periodo de cultivo. Después de 14 días, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por 0,5 mg/ml de una disolución de tripsina, 0,2 mg/ml de EDTA (ácido etilendiaminatetraacético) (Life Technologies B.V. Breda, Países Bajos), y se incubó durante 5 minutos a 37 °C en este medio. Después de este periodo de incubación, se desprendieron las agrupaciones de
20 células de los folículos pilosos. Éstas se recogieron por centrifugación a 300 g a 4 °C durante 5 minutos en una centrifugadora Eppendorf 5804R (VWR International, Países Bajos). Se contó el número de células y se expresó como la cantidad de células proliferadas por ml de medio de cultivo.

[0117] Resultados: Los resultados muestran que la cantidad de queratinocitos proliferados fue
25 significativamente elevada tras el tratamiento con ambos compuestos de vanadio, es decir, OVAN y BMOV, con respecto a la situación de control. Los resultados muestran además que BMOV parece ser más potente que OVAN. En general, estos resultados muestran que los compuestos de vanadio son particularmente eficaces en promover la proliferación celular, así como la supervivencia celular en condición de cultivo (véase Figura 1).

REIVINDICACIONES

1. Composición para generar un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado a partir de al menos una célula madre de folículo piloso, comprendiendo dicha composición al menos un compuesto antiapoptótico, donde dicho agente antiapoptótico es un compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable, al menos un compuesto antioxidante seleccionado del grupo de quercetina, monohidroxietilrutósido, vitamina C, ácido lipoico, mesilato de deferoxamina y vitamina E, al menos un compuesto potenciador de células madre seleccionado del grupo de eritropoyetina, célula CD34-positiva y ácido retinoico, al menos un compuesto de la matriz extracelular seleccionado del grupo de plasma rico en plaquetas, laminina, colágeno IV, sulfato de heparina, entactina y sulfato de condroitina, y al menos un factor inductor de la diferenciación seleccionado del grupo de factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento de insulina, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epitelial, taurina, activina A y 5-azacitidina.
2. Composición según la reivindicación 1, donde el compuesto de vanadio fisiológicamente aceptable se selecciona del grupo que consiste en bis(maltolato)oxovanadio, oxovanadio y ortovanadio.
3. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende además uno o más compuestos seleccionados del grupo de una triyodotironina, estradiol, progesterona, extracto de tejido, insulina, transferrina, selenio, L-cisteína, adenosina trifosfato-cloruro de magnesio y L-leucina.
4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el compuesto antioxidante se selecciona de quercetina y mono-hidroxietilrutósido.
5. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el compuesto potenciador de células madre es eritropoyetina.
6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el compuesto de la matriz extracelular es plasma rico en plaquetas.
7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tipo de célula deseado se selecciona del grupo de célula nerviosa, célula fotorreceptora, cardiomiocito, odontoblasto, célula epitelial, célula de queratinocito, célula de fibroblasto, célula grasa, glóbulo sanguíneo, célula inmunitaria, célula muscular, célula dérmica, célula de folículo piloso, osteoblasto, osteocito, osteoclasto y condrocito.
8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el tipo de tejido deseado se selecciona del grupo de tejido neural, tejido ocular, tejido cardíaco, tejido dental, tejido epitelial, tejido de queratinocito, tejido de fibroblasto, tejido conjuntivo, tejido adiposo, tejido muscular, tejido dérmico, tejido piloso, tejido óseo y tejido de cartílago.
9. Un procedimiento *in vitro* de generación de un tipo de célula y/o tipo de tejido deseado a partir de al menos una célula madre de folículo piloso, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - (a) proporcionar al menos una célula madre de folículo piloso;
 - (b) cultivar la al menos una célula madre de folículo piloso en un medio para obtener una población de células madre de folículo piloso;
 - (c) poner en contacto la población de células madre de folículo piloso de la etapa (b) con una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y permitir que dicha población de células madre de folículo piloso se diferencie en el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado en condiciones favorables para la diferenciación; y
 - (d) recoger el tipo de célula y/o tipo de tejido deseado.
10. Kit que comprende la composición según las reivindicaciones 1-8.

FIGURA 1

