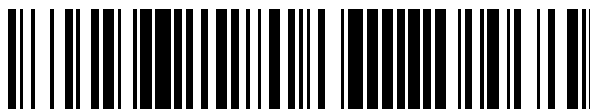


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 637**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

A61L 27/00 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61K 35/12 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.07.2011 PCT/JP2011/067045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12108069**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2011 E 11858349 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2674484**

54 Título: **Método para producir un primordio de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante**

30 Prioridad:

09.02.2011 JP 2011026614

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

24.06.2019

73 Titular/es:

ORGAN TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
5-1-4, Toranomon, Minato-ku
Tokyo 105-0001, JP

72 Inventor/es:

TOYOSHIMA, KOH-EI y
TSUJI, TAKASHI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 717 637 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

Método para producir un primordio de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante

5 [Campo técnico]

La invención de la presente solicitud se refiere a un método para producir un germen de órgano (primordio) para trasplante en el que el germen de órgano regenerativo (elaborado por bioingeniería) funciona en conexión apropiada con el tejido epitelial en un lado receptor en una técnica médica de reemplazo de órgano y regenerativa usando un germen de órgano regenerativo. Además, se describe una composición que contiene un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante producida mediante el método de la invención, y un método para trasplantar un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante.

15 [Antecedentes de la técnica]

La medicina regenerativa, en la que una parte u órgano del cuerpo que se ha vuelto disfuncional debido a diversas enfermedades o lesiones traumáticas se reemplaza por una parte u órgano del cuerpo regenerado, se muestra prometedora como una técnica médica de última generación para complementar el trasplante médico. (bibliografía no de patente 1). En investigaciones anteriores sobre medicina regenerativa, se han logrado avances en la terapia de trasplante de células madre en la que las células madre o las células precursoras se trasplantan a un tejido lesionado o un órgano parcialmente disfuncional para restaurar su función.

En la regeneración de tejido bidimensional que consiste en un solo tipo de célula, una tecnología de regeneración tisular en la cual las células epiteliales cutáneas o corneales, células musculares cardíacas y similares se organizan cultivando las células en forma de lámina usando la tecnología de lámina celular está cerca de la aplicación práctica. A ese respecto, ahora es posible regenerar el tejido funcional de la piel mediante la estratificación de los fibroblastos, que son células mesenquimatosas, y células epidérmicas de la piel para reproducir artificialmente una estructura de capa histológicamente apropiada, y esta técnica se ha aplicado clínicamente en el tratamiento de quemaduras graves.

Paralelamente, se sabe que en un órgano, múltiples tipos de células funcionales adoptan una disposición tridimensional para expresar una función única. Casi todos los órganos se generan por las interacciones entre las células epiteliales y las células mesenquimatosas durante el período fetal, y exhiben morfología y funciones orgánicas únicas. En las técnicas actuales de medicina regenerativa, es difícil disponer múltiples tipos de células en una forma tridimensional, y aún no se ha desarrollado una construcción de órgano regenerativa que pueda funcionar inmediatamente *ex vivo*.

Recientemente, se está llevando a cabo una investigación con el objetivo de regenerar órganos mediante la regeneración de un germen de órgano y la reproducción de su proceso de desarrollo para anejos epiteliales, tales como los dientes y las glándulas salivales, y anejos cutáneos, tales como folículos pilosos. Estos órganos no están directamente relacionados con el mantenimiento de la vida, pero se sabe que son objeto de pérdida o disfunción orgánica. Como ejemplo, se puede mencionar la pérdida de dientes debida a caries dental, lesión e hipoplasia del germen dental, trastorno de la secreción salival asociado al envejecimiento y la pérdida de pelo debido a la calvicie de patrón masculino y la displasia folicular del pelo. Este tipo de pérdida o disfunción orgánica tiene un gran impacto en la QOL (calidad de vida) y, por lo tanto, se han generado altas expectativas en la restauración funcional mediante la regeneración de órganos. En particular, en la regeneración dental, la regeneración de un diente funcional que tiene todas las funciones fisiológicas de un diente se ha demostrado mediante el trasplante de germen dental regenerativo en el que las células epiteliales derivadas de germen dental embrionario y las células mesenquimatosas derivadas de germen dental embrionario se disponen apropiadamente en una forma tridimensional, el trasplante de una unidad dental regenerativa que se regeneró ectópicamente *in vivo* y el trasplante de una unidad funcional que contiene un diente, hueso alveolar y membrana periodontal (por ejemplo, consulte la bibliografía de patente 1). Además, también se ha demostrado que el germen dental regenerativo o una unidad dental regenerativa que tiene una disposición y direccionalidad celulares características similares se pueden obtener cuando se usan células epiteliales de la cavidad bucal o células cultivadas primarias de las mismas como células epiteliales (por ejemplo, consulte la bibliografía de patente 2), cuando se usan células derivadas de amnios como células mesenquimatosas (por ejemplo, consulte la bibliografía de patente 3), y cuando se usan células obtenidas mediante inducción por diferenciación de células madre totipotentes como células mesenquimatosas (por ejemplo, consulte la bibliografía de patente 4).

A partir de estos resultados de investigación, se puede decir que se ha demostrado la viabilidad de la regeneración funcional de órganos mediante el trasplante de un germen de órgano regenerativo o un órgano regenerado a partir de un germen de órgano regenerativo, y ahora se buscan técnicas médicas de reemplazo de órganos y regenerativas que usan primordios de órganos regenerativos para otros anejos epiteliales.

[Lista de citas]

65 [Bibliografía de patente]

Bibliografía de Patente 1: Publicación internacional PCT n.º WO 2006/129672

Bibliografía de Patente 2: Solicitud de Patente No Examinada Japonesa, Primera Publicación N.º 2008-29756

Bibliografía de Patente 3: Solicitud de Patente No Examinada Japonesa, Primera Publicación N.º 2008-206500

Bibliografía de Patente 4: Solicitud de Patente No Examinada Japonesa, Primera Publicación N.º 2008-200033

[Bibliografía no de patente]

Bibliografía no de patente 1: Sharpe PT, Young CS. Test-tube teeth. Sc. Am. 293, 34-41, 2005

[Sumario de la Invención]

[Problema técnico]

En general, se sabe que los anejos epiteliales, tales como los folículos pilosos y las glándulas sebáceas, las glándulas lagrimales y las glándulas salivales, se generan por la interacción entre células epiteliales derivadas de ectodermo o de endodermo y células mesenquimatosas derivadas de mesodermo o de cresta neural durante el periodo fetal.

Un folículo piloso, que es un anejo cutáneo, repite el crecimiento y la regresión (el ciclo capilar) a lo largo de la vida del individuo. Se sabe que la regeneración de un bulbo piloso durante el período de crecimiento es inducida por un mecanismo molecular similar al de la etapa naciente del órgano del folículo piloso. Se cree que la regeneración de un bulbo piloso durante dicho ciclo capilar es inducida por células papilares pilosas, que son células mesenquimatosas. En el período de crecimiento, se cree que las células madre epiteliales del folículo piloso son inducidas por la diferenciación de las células papilares pilosas, que son células mesenquimatosas, para regenerar un bulbo piloso. Dado que existen nichos de células madre derivadas de la cresta neural en la región del abultamiento y en la región inferior, se cree que los folículos pilosos mantienen múltiples nichos de células madre y funcionan como un conjunto de células madre. Se ha descrito un método para cultivar células papilares pilosas que mantienen la capacidad de inducir la formación de folículos pilosos. Aunque todavía no hay informes definitivos sobre los nichos de células madre de las células mesenquimatosas del folículo piloso, la papila pilosa contiene células que pueden diferenciarse en condrocitos, células sanguíneas y adipocitos, y las células SKIP que regeneran los folículos pilosos y la dermis de la piel se pueden obtener de tejido dérmico de piel adulta, lo que sugiere la existencia de células madre mesenquimatosas del folículo piloso. A partir de lo anterior, se sugiere la posibilidad de una regeneración completa del órgano por células derivadas de adultos que no se ha realizado en ningún otro órgano, y hay esperanzas de la aplicación práctica de técnicas de regeneración de folículos pilosos clínicamente aplicables.

Con el fin de establecer técnicas médicas de regeneración del folículo piloso suficientes para la aplicación clínica, es necesaria la formación y elongación del pelo que tiene un tallo piloso adecuado para el sitio de trasplante y cuyo folículo piloso regenerativo tiene una estructura tisular normal. Además, se espera que el mantenimiento de las células madre por un nicho de células madre específicas del folículo piloso y la inducción de los folículos pilosos por el ciclo capilar se puedan producir, y que los folículos pilosos tengan las glándulas sebáceas asociadas y los músculos erectores del pelo y sean funcionales con reactividad para piloerección por el nervio simpático. En el pasado, se han realizado intentos de regeneración del folículo piloso mediante la regeneración de la región variable del folículo piloso mediante el reemplazo de las células mesenquimatosas (células de papila pilosa y células de la vaina de la raíz dérmica), neogénesis del folículo piloso por células mesenquimatosas que tienen capacidad inductora del folículo piloso, reconstrucción del folículo piloso por células epiteliales/mesenquimatosas, y similares. A ese respecto, la reconstrucción del folículo piloso y la regeneración del germen del folículo piloso se entienden como modelos de técnicas médicas de reemplazo de órganos y regenerativas, y recientemente se demostró que el germen de folículo piloso regenerativo reconstruido mediante el método de germen de órganos desarrollado por los inventores de la presente invención emula un desarrollo normal para regenerar los folículos pilosos y el pelo. Sin embargo, todavía debe haber un informe de un modelo de regeneración de folículos pilosos clínicamente aplicable en el que los folículos pilosos que son completamente funcionales *in vivo* se hayan regenerado.

El pelo, que es un anejo cutáneo, se forma mediante cambios en la piel, y se produce a partir de los folículos pilosos formados por la interacción entre dos grupos de células vagamente clasificados, es decir, células epiteliales y células mesenquimatosas. Por lo tanto, la estrategia básica es regenerar los folículos pilosos mediante el trasplante de estos dos tipos de células en una región diana de la piel. En un método que se ha descrito para realizar esta estrategia básica, toda la piel, incluidos los folículos pilosos, se regenera mediante un método (método de cámara de injerto) en el que se mezclan células papilares pilosas cultivadas y células epidérmicas de rata recién nacida en una herida de injerto formada extirpando todo el grosor de la piel dorsal de un ratón lampiño. Sin embargo, en este método, es esencial formar una gran herida de injerto para regenerar toda la piel, lo que dificulta su amplia implementación como técnica médica debido a su naturaleza altamente invasiva.

Se ha descrito otro método en el que células epiteliales y células mesenquimatosas se mezclan y trasplantan de manera similar al tejido subcutáneo o debajo de la cápsula renal para regenerar los folículos pilosos, y después los folículos pilosos regenerados ectópicamente se retrasplantan por vía intracutánea. En este método, es posible trasplantar los folículos pilosos regenerados a la piel de un receptor diana *mutatis mutandis* de acuerdo con un método basado en las técnicas de trasplante de cabello existentes, pero se requieren otras partes del cuerpo u órganos como

la ubicación para regenerar los folículos pilosos. Asimismo, se sabe que se forman quistes con frecuencia cuando las células epiteliales se trasplantan a tejido subcutáneo o similar, y estos quistes comprimen los tejidos circundantes lo que puede causar dolor asociado con inflamación. Por lo tanto, esta técnica en sí conlleva el riesgo de causar nuevas enfermedades.

Con el fin de resolver los problemas descritos anteriormente, el método de germen de órgano se ha presentado en una solicitud como una patente anterior (bibliografía de patente 1). En esta patente anterior, se proporciona un método por el cual un órgano puede regenerarse a partir de un germen de órgano pequeño producido artificialmente. En la regeneración dental, ya se ha demostrado que los dientes regenerativos que normalmente funcionan erupcionan en la cavidad bucal a partir de un germen dental regenerativo trasplantado en el hueso de la mandíbula. Se cree que la erupción se produce de forma autónoma debido al crecimiento del diente regenerativo sin ninguna conexión directa entre las células epiteliales del diente regenerado y el epitelio de la mucosa bucal. Sin embargo, cuando la conexión con la capa epidérmica de la piel es necesaria como en el caso de los folículos pilosos, es necesario hacer crecer el pelo en la superficie del cuerpo a partir de los folículos pilosos regenerados, y ha surgido el problema de que pueden formarse quistes si el pelo no crece a partir de los folículos pilosos trasplantados.

Los anejos cutáneos, tales como el pelo y las glándulas sebáceas, son omnipresentes en la piel y existen en cantidades extremadamente grandes. En particular, el pelo existe en grandes cantidades en sitios específicos y, por lo tanto, exhibe valor estético y funcional. Además, los folículos pilosos, que son órganos pequeños que producen el pelo, están conectados dentro de la piel con una direccionalidad apropiada a la capa epidérmica a través de los poros, y funcionan para hacer crecer el pelo (tallos) desde la superficie del cuerpo.

En técnicas de regeneración mediante, por ejemplo, el trasplante de glándulas exocrinas que tienen conductos tales como glándulas salivales y lagrimales, las glándulas salivales o lagrimales trasplantadas solo pueden exhibir su función una vez que están correctamente conectadas al conducto del lado del receptor a través del cual pasa la saliva o similar. Sin embargo, cuando se trasplanta una glándula salival o similar que tiene un conducto, se ha planteado un problema ya que la glándula trasplantada no funciona porque no se puede conectar correctamente con el conducto del lado del receptor.

En otras palabras, se entiende que cuando se regeneran anejos epiteliales tales como folículos pilosos o una glándula salival, la conexión con la direccionalidad y la forma adecuadas entre el tejido epitelial del lado del receptor y el órgano regenerado es extremadamente importante para el ejercicio de la función del órgano regenerado.

[Solución al problema]

Como se ha descrito anteriormente, para regenerar anejos epiteliales tales como folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas salivales y glándulas lagrimales y permitirles ejercer una función prescrita, varios trasplantes deben conectarse adecuadamente con el receptor. Como resultado de un agudo examen para resolver los problemas descritos anteriormente, los inventores de la presente invención descubrieron el método plástico de conexión de tejido interepitelial, en el cual un germen de órgano regenerado por el método de germen de órgano se conecta a un tejido receptor a través de una guía. Los inventores de la presente invención descubrieron además que este método permite asegurar la dirección de la polaridad del germen de órgano regenerativo y mejorar la adhesión con el lado del receptor después del trasplante, y permite que el órgano regenerado se vincule adecuadamente con el receptor para regenerarlo funcionalmente.

Concretamente, la presente invención se refiere a un método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para el trasplante, que comprende:

preparar un germen de órgano regenerativo poniendo en contacto estrecho una primera masa celular que consiste sustancialmente en células mesenquimatosas y una segunda masa celular que consiste sustancialmente en células epiteliales y cultivar estas masas celulares dentro de un soporte; e

insertar la guía en el germen de órgano regenerativo, en el que la guía se inserta desde el lado de la célula epitelial de las primera y segunda masas celulares que se convierte en el germen de órgano regenerativo de manera que la guía penetra a través de la fracción de células epiteliales y la fracción de células mesenquimatosas,

en el que la guía es una fibra hecha de un polímero, una fibra metálica, una fibra de carbono, una fibra química y una fibra animal o vegetal natural y en el que el diámetro de la guía es de 5 a 100 μm y la longitud de la guía es 1 a 10 mm, y

en el que el germen de órgano regenerativo es un germen de anejo epitelial.

En el presente documento, en una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para el trasplante de la presente invención, el método comprende cultivar adicionalmente el germen de órgano regenerativo durante varios días después de insertar la guía.

En una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para el trasplante de la presente invención, al menos una de las primera y segunda masas celulares se deriva de un órgano que es la diana de regeneración.

En una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante de la presente invención, la primera masa celular y la segunda masa celular se derivan de un órgano que es la diana de regeneración.

- 5 En el método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante de la presente invención, el germen de órgano regenerativo es un germen de anejo epitelial.

- 10 En una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante de la presente invención, el germen de órgano regenerativo es uno de primordios de órgano seleccionados del grupo que consiste en germen de folículo piloso regenerativo, germen de glándula sudorípara regenerativo, germen de glándula sebácea regenerativo, germen de glándula salival regenerativo, germen de glándula mamaria regenerativo, germen de nefrona renal regenerativo, germen de glándula lagrimal regenerativo y germen de glándula endocrina regenerativo.

- 15 En una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante de la presente invención, el germen de órgano regenerativo es un germen de folículo piloso regenerativo y las células epiteliales son células epiteliales de la región del abultamiento o células epiteliales basales de la matriz capilar.

- 20 En una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante de la presente invención, el germen de órgano regenerativo es un germen de folículo piloso regenerativo y las células mesenquimatosas son células de papila pilosa o células de la vaina de la raíz dérmica.

- 25 En una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante de la presente invención, el germen de órgano regenerativo es un germen de glándula salival regenerativo y las células epiteliales son células epiteliales derivadas de glándula salival y las células mesenquimatosas son células mesenquimatosas derivadas de glándula salival.

- 30 En una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante de la presente invención, el germen de órgano regenerativo es un germen de glándula lagrimal regenerativo y las células epiteliales son células epiteliales derivadas de glándula lagrimal y las células mesenquimatosas son células mesenquimatosas derivadas de glándula lagrimal.

- 35 En una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante de la presente invención, la guía es una fibra química.

En una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante de la presente invención, la guía es bioabsorbible.

- 40 En una realización del método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante de la presente invención, la guía es un hilo de nailon.

- 45 La presente divulgación también describe una composición que comprende un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante producida mediante un método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante.

- 50 La presente divulgación también describe un método para el trasplante de un germen de órgano regenerativo para trasplante que comprende trasplantar un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante producida mediante un método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante en un sitio diana.

- 55 En el método descrito en el presente documento para el trasplante de un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante, una parte en el lado de las células epiteliales del germen de órgano regenerativo trasplantado y las células epiteliales de la diana se alargan y se conectan a lo largo de la guía manteniendo la guía en un estado en el que sobresale de un sitio de trasplante.

- 60 Asimismo, en el método para el trasplante de un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante descrito en el presente documento, el germen de órgano regenerativo es un germen de órgano destinado a la regeneración de un órgano que tiene un conducto, y durante el trasplante del germen de órgano regenerativo, la guía se inserta en un conducto existente en el sitio diana y una parte en el lado de las células epiteliales del germen de órgano regenerativo y el conducto están conectados, y por lo tanto la parte en el lado de las células epiteliales del germen de órgano regenerativo se alarga a lo largo de la guía y se conecta al conducto del sitio diana.

[Efectos de la invención]

- 65 La presente invención puede proporcionar un germen de órgano regenerativo para trasplante que puede mejorar la adhesión al tiempo que garantiza la dirección de la polaridad del germen de órgano regenerativo y retiene la

direccionalidad apropiada con respecto al tejido epitelial del lado del receptor después del trasplante. Asimismo, el germen de órgano regenerativo para trasplante producido por la presente invención tiene una guía y, por lo tanto, la operación durante el trasplante puede simplificarse y la profundidad y la dirección del trasplante y similares pueden ajustarse fácilmente durante el trasplante.

Asimismo, dado que las células epiteliales del germen de órgano regenerativo y la capa epitelial del lado del receptor (células epiteliales) están conectadas a lo largo de la guía, la formación de quistes derivados del germen de órgano regenerativo se puede suprimir, especialmente en el curso de la formación del folículo piloso. Asimismo, en una glándula exocrina o similar que tiene un conducto tal como una glándula salival, las células epiteliales se alargan a lo largo de la guía, y por lo tanto se puede mejorar la eficacia de conexión con el conducto del lado del receptor.

Además, el germen de órgano regenerativo producido por la presente invención se puede aplicar a anejos epiteliales que incluyen folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas salivales y similares, y no se limita a la regeneración de una superficie del cuerpo y se puede aplicar en la regeneración de los órganos que están conectados a una luz, tal como en la cavidad bucal, el tracto intestinal o un tejido endocrino, a través de una estructura luminal. Dado que la presente invención puede aplicarse también a la regeneración de estos órganos y tejidos, proporciona una técnica que es aplicable no solo a los anejos cutáneos sino también a la medicina regenerativa para una amplia variedad de órganos y tejidos.

[Breve descripción de los dibujos]

[Figura 1] La figura 1 es una vista esquemática que ilustra un flujo de producción de un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante usando células epiteliales derivadas de epitelio embrionario de ratón y células mesenquimatosas derivadas de epitelio embrionario de ratón, que es una realización de la presente invención.

[Figura 2] La figura 2 muestra el estado inmediatamente después, tres días después y diez días después del trasplante del germen de folículo piloso regenerativo para el trasplante producido por las células epiteliales y las células mesenquimatosas derivadas de epitelio embrionario de ratón en un epitelio receptor. La fila superior muestra fotos del epitelio, y la fila inferior muestra los resultados al teñir con HE una sección del sitio de trasplante y observarla bajo un microscopio de fluorescencia.

[Figura 3] La figura 3 es una vista esquemática que ilustra un flujo de producción de un germen de folículo piloso regenerativo para trasplante usando células epiteliales de la región del abultamiento derivadas de bigotes de ratón adulto y células papilares cultivadas derivadas de bigotes de ratón adulto, que es una realización de la presente invención.

[Figura 4] La figura 4A muestra el estado de inserción de una guía en un germen de folículo piloso regenerativo durante el cultivo. La figura 4B muestra el sitio de trasplante (indicado por la flecha) inmediatamente después del trasplante del germen de folículo piloso regenerativo. La figura 4C muestra el sitio de trasplante 21 días después del trasplante.

[Figura 5] La figura 5 muestra los resultados en la tinción con HE de una sección de tejido de un folículo piloso regenerado mediante el trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo derivado de bigotes de ratón adulto (fila superior), y los resultados al observar la fluorescencia de GFP en una sección de tejido del folículo piloso regenerador (fila inferior).

[Figura 6] La figura 6a muestra una foto de una sección transversal de un bigote regenerativo regenerado capturada con un microscopio óptico después del trasplante de un folículo piloso regenerativo derivado de un bigote de ratón adulto para trasplante, que es una realización de la presente invención. La figura 6b muestra una foto de la superficie de un tallo piloso del bigote regenerativo capturada con un microscopio electrónico.

[Figura 7] La figura 7 muestra el estado 27 días después, 31 días después, 41 días después y 46 días después del trasplante de un bigote de ratón regenerativo crecido por trasplante de un folículo piloso regenerativo para trasplante, que es una realización de la presente invención. Se rastrea el crecimiento de los pelos regenerativos individuales (los pelos regenerativos distinguidos se muestran mediante la marca de la flecha y la marca del triángulo), respectivamente.

[Figura 8] La figura 8 es un gráfico que ilustra el ciclo capilar de un bigote regenerativo. Se ilustran el período de crecimiento y el período de regresión desde el primer crecimiento del pelo hasta el tercer crecimiento del pelo, respectivamente. El "Control" indica el promedio de tres ciclos capilares seguidos después de trasplantar un bigote natural de ratón en el lomo de un ratón lampiño y volver a hacerlo crecer.

[Figura 9] La figura 9 es una vista esquemática que ilustra un flujo de producción de un germen de glándula salival regenerativo para trasplante usando células epiteliales derivadas de tejido epitelial submandibular embrionario de ratón y células mesenquimatosas derivadas de tejido mesenquimatoso de glándula submandibular de ratón, que es una realización de la presente invención. En la figura 9, el tejido epitelial aislado de un germen de glándula submandibular extraído se muestra en la fila superior de fotos, y el tejido mesenquimatoso aislado de un germen de glándula submandibular se muestra en la fila inferior de fotos. En las fotos que muestran el germen de glándula salival

regenerativo producido en la figura 9, "E" indica una masa celular de células epiteliales y "M" indica una masa celular de células mesenquimatosas. Como se muestra en la figura 9, los primordios de glándula submandibular en diferentes fases de desarrollo (temprana, media, tardía) se obtuvieron de un embrión de ratón a una edad gestacional de 13,5 días.

[Figura 10] La figura 10 muestra fotos capturadas con un microscopio óptico que representan el estado de un germen de glándula salival y un germen de glándula salival regenerativo en varios momentos (inicio del cultivo, después de 12 horas de cultivo, después de 24 horas de cultivo, después de 36 horas de cultivo, después de 48 horas de cultivo, después de 60 horas de cultivo, después de 72 horas de cultivo) durante el cultivo de órganos de una glándula submandibular extraída de un embrión de ratón y un germen de glándula salival regenerativo para trasplante producido usando células epiteliales derivadas de tejido epitelial de glándula submandibular embrionaria de ratón y células mesenquimatosas derivadas del tejido mesenquimatoso de glándula submandibular embrionaria de ratón. También se muestran los resultados de la tinción con HE del germen de glándula salival regenerativo 72 horas después del cultivo.

[Figura 11] La figura 11 muestra fotos capturadas con un microscopio óptico que representan el estado de un germen de glándula salival regenerativo en varios tiempos transcurridos (después de 12 horas de cultivo, después de 24 horas de cultivo, después de 36 horas de cultivo, después de 44 horas de cultivo, después de 60 horas de cultivo) durante un cultivo de órganos de 60 horas tras insertar un hilo bioabsorbible como guía en un germen de glándula salival regenerativo para trasplante producido usando células epiteliales derivadas de tejido de glándula submandibular embrionaria de ratón y células mesenquimatosas derivadas de tejido mesenquimatoso de tejido de glándula submandibular embrionaria de ratón. La fila inferior de fotos muestra el germen de glándula salival regenerativo después de 60 horas de cultivo de órganos. A ese respecto, el lado de las células epiteliales del germen de glándula salival regenerativo ha comenzado a moverse/alargarse a lo largo del hilo guía para exhibir una estructura similar a un conducto (parte marcada con flechas).

[Figura 12] La figura 12 muestra fotos que representan cada etapa (fijación, exposición de la parte del conducto de la glándula parótida, extracción de la glándula parótida, fijación del gel y sutura) al trasplantar un germen de glándula salival regenerativo con una guía para trasplante producido usando células epiteliales derivadas de tejido epitelial de glándula submandibular embrionaria de ratón y células mesenquimatosas derivadas de tejido mesenquimatoso de glándula submandibular embrionaria de ratón en una parte de conducto de una glándula parótida de un ratón adulto. En la figura 12, "el" indica una glándula lagrimal, "ma" indica un masetero, "p" indica una glándula parótida, "od" indica un tejido adiposo, "pd" indica un conducto de glándula parótida, y "RO" indica una glándula submandibular regenerativa.

[Figura 13] La fila superior en la figura 13 muestra fotos capturadas con un microscopio óptico que representan el estado inmediatamente antes del trasplante de un germen de glándula salival regenerativo con una guía para trasplante producido usando células epiteliales derivadas de tejido epitelial de glándula submandibular embrionaria de ratón y células mesenquimatosas derivadas de tejido mesenquimatoso de glándula submandibular embrionaria de ratón y el estado 34 días después del trasplante en una parte de conducto de una glándula parótida de un ratón adulto del que se extirpó la glándula parótida. En estas fotos, "A" indica un conducto que se extiende desde el germen de glándula salival regenerativo trasplantado, "B" indica el germen de glándula salival regenerativo trasplantado, y "pd" indica la glándula parótida. La fila inferior en la figura 13 muestra los resultados tras la tinción con HE de la glándula submandibular regenerativa 34 días después del trasplante. Las flechas indican células de tipo acinoso serosas.

[Figura 14] La figura 14 muestra fotos capturadas tras inyectar azul de Evans desde el lado del conducto a un germen de glándula salival regenerativo 30 días después del trasplante en un ratón adulto. En la figura 14, "A" indica el sitio de inyección de azul de Evans y "B" indica el sitio de trasplante de la glándula submandibular regenerativa.

[Figura 15] La figura 15 es una gráfica que ilustra una comparación de transiciones en peso y tasa de supervivencia entre un ratón deficiente en glándulas salivales del que se extirparon todas las glándulas salivales y un ratón del que se extirparon todas las glándulas salivales y después un germen de glándula salival regenerativo con una guía de la presente invención se trasplantó a un sitio de glándula submandibular.

[Figura 16] La figura 16 es una vista esquemática que ilustra un flujo de producción de un germen de glándula lagrimal regenerativo para trasplante usando células epiteliales derivadas de tejido de glándula lagrimal embrionarias de ratón y células mesenquimatosas derivadas de tejido mesenquimatoso de glándula lagrimal embrionaria de ratón, que es una realización de la presente invención. La foto de la izquierda se capturó con un estereomicroscopio y muestra un germen de glándula lagrimal extraído de un embrión de ratón en una edad gestacional de 16,5 a 17,5 días. Las otras fotos se capturaron con un estereomicroscopio y representan un tejido epitelial aislado del germen de glándula lagrimal (la foto superior en la columna central), un tejido mesenquimatoso aislado del germen de glándula lagrimal (la foto inferior en la columna central), y un germen de glándula lagrimal regenerativo que fue reconstruido (foto a la derecha).

[Figura 17] La figura 17 muestra fotos capturadas con un microscopio óptico que representan el estado de un germen de glándula lagrimal y un germen de glándula lagrimal regenerativo en varios momentos (inicio del cultivo, después de 1 día de cultivo, después de 2 días de cultivo, después de 3 días de cultivo, después de 4 días de cultivo) durante

el cultivo de órganos de un germen de glándula lagrimal extraído de un embrión de ratón y un germen de glándula lagrimal regenerativo para trasplante producido usando células epiteliales derivadas de tejido epitelial de glándula lagrimal embrionaria de ratón y células mesenquimatosas derivadas de tejido mesenquimatosos de glándula lagrimal embrionaria de ratón.

[Figura 18] La figura 18 muestra fotos capturadas con un microscopio óptico que representan el estado inmediatamente antes del trasplante de un germen de glándula lagrimal regenerativo con una guía para trasplante producido usando células epiteliales derivadas de tejido epitelial de glándula lagrimal embrionaria de ratón y células mesenquimatosas derivadas de tejido mesenquimatosos de glándula lagrimal embrionaria de ratón y el estado 20 días después del trasplante en una parte de conducto de una glándula lagrimal de un ratón adulto del cual se extirpó la parte acinosa de la glándula lagrimal. En estas fotos, "A" indica una parte en la que se adhirió el germen de glándula lagrimal regenerativo trasplantado, "B" indica la dirección del ojo y "dt" indica un conducto de la glándula lagrimal.

[Descripción de las realizaciones]

Las realizaciones de la presente solicitud se explicarán a continuación en detalle.

Una primera realización del método de producción de acuerdo con la presente invención es un método para producir un germen de órgano regenerativo para trasplante en un mamífero (por ejemplo, un ser humano), que incluye la inserción de una guía en el germen de órgano regenerativo durante el cultivo producido por el cultivo de órganos de células mesenquimatosas y células epiteliales.

En la presente memoria descriptiva, "células mesenquimatosas" indican células derivadas de tejido mesenquimatoso y células obtenidas cultivando dichas células derivadas de tejido mesenquimatoso, y "células epiteliales" indican células derivadas de un tejido epitelial y células obtenidas cultivando dichas células derivadas de tejido epitelial.

Asimismo, en la presente memoria descriptiva, los "anejos epiteliales" se refieren a los órganos formados por la interacción entre las células epiteliales derivadas de ectodermo o de endodermo y las células mesenquimatosas derivadas de mesodermo o de cresta neural, tales como órganos derivados de epitelio endodérmico, anejos ectodérmicos, glándulas endocrinas y glándulas exocrinas conectadas a otro tejido epitelial a través de un conducto o similar. Más específicamente, los "anejos epiteliales" indican, por ejemplo, anejos epidérmicos tales como folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas lagrimales y glándulas sebáceas, así como órganos que están conectados a una luz tal como en la cavidad bucal, el tracto intestinal o un tejido endocrino, a través de una estructura luminal.

Asimismo, en la presente memoria descriptiva, los "anejos ectodérmicos" indican los órganos derivados de ectodermos entre los "anejos epiteliales", tales como los anejos epidérmicos como folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas lagrimales, glándulas sebáceas y similares.

A continuación, se explicará el germen de órgano regenerativo usado en el método de la presente invención.

El germen de órgano regenerativo se puede producir mediante un método que incluye: poner en contacto estrecho una primera masa celular que consiste sustancialmente en células mesenquimatosas y una segunda masa celular que consiste sustancialmente en células epiteliales y cultivar estas masas celulares dentro de un soporte.

"Poner en contacto estrecho una primera masa celular que consiste sustancialmente en células mesenquimatosas y una segunda masa celular que consiste sustancialmente en células epiteliales y el cultivo de estas masas celulares dentro de un soporte" se describe en, por ejemplo, las bibliografías de patente 1 a 4, así como en la solicitud de patente japonesa no examinada, primera publicación N.º 2008-29757.

En la presente memoria descriptiva, cuando se produce, por ejemplo, un germen de folículo piloso mediante el método descrito anteriormente, el germen de folículo piloso producido se denominará "germen de folículo piloso regenerativo".

La primera masa celular y la segunda masa celular consisten, cada una, sustancialmente en solo células mesenquimatosas o solo células epiteliales. En la presente invención, la frase "consiste sustancialmente en solo células mesenquimatosas" significa que la masa celular realiza una función idéntica a una masa celular que consiste solo en células mesenquimatosas. Preferentemente indica un estado en el que la masa celular no incluye nada que no sean células que son células mesenquimatosas en la medida de lo posible. Asimismo, la masa celular puede incluir células de diferentes tipos siempre que sean células mesenquimatosas. Lo mismo se aplica a la frase "consiste sustancialmente en solo células epiteliales".

En el presente documento, una masa celular se refiere a un estado en el que las células están estrechamente adheridas, y puede ser un tejido o un agregado celular preparado a partir de células discretas. El uso de un tejido es ventajoso porque es fácil obtener un órgano con la disposición y la forma correctas de las células, pero puede haber limitaciones en la cantidad que se puede obtener. Las células cultivadas también se pueden usar para preparar un agregado celular, y una masa celular es relativamente fácil de obtener cuando se usan células cultivadas, haciendo que las células cultivadas sean preferibles al menos desde esta perspectiva.

Al menos una de las células mesenquimatosas y las células epiteliales usadas en la presente invención se deriva preferentemente del órgano (incluyendo un tejido que pertenece al órgano) que es la diana de regeneración. De este modo, el órgano diana puede formarse fácilmente usando células que ya están orientadas al órgano diana. Asimismo, con el fin de producir el órgano diana de manera más fiable, es más preferible que tanto las células mesenquimatosas como las células epiteliales se deriven del órgano que es la diana de regeneración.

El germen de órgano regenerativo que es el objeto de la presente invención es un germen de órgano de un anejo epitelial. Otros ejemplos de la presente invención pueden incluir germen regenerativo de folículo piloso, germen de glándula sudorípara regenerativo, germen de glándula sebácea regenerativo, germen de glándula salival regenerativo, germen de glándula mamaria regenerativo, germen de nefrona renal regenerativo, germen de glándula lagrimal regenerativo y germen de glándula endocrina regenerativo. Cuando se producen estos primordios de órgano regenerativos, se pueden usar también células mesenquimatosas o células epiteliales derivadas del órgano diana, y también se pueden usar células mesenquimatosas o células epiteliales obtenidas mediante la inducción de células indiferenciadas. Por ejemplo, cuando se produce un germen de folículo piloso regenerativo, las células papilares pilosas, las células de la vaina de la raíz dérmica, las células mesenquimatosas de la piel naciente y las células mesenquimatosas del folículo piloso inducidas a partir de células iPS o células ES se pueden usar como células mesenquimatosas y las células de la capa más externa de la vaina externa de la raíz de la región del abultamiento, las células epiteliales basales de la matriz capilar y las células epiteliales del folículo piloso inducidas a partir de células iPS o células ES se pueden usar como células epiteliales. Asimismo, cuando se produce un germen de glándula sudorípara regenerativo, células mesenquimatosas de piel naciente, células dérmicas agrupadas de folículos pilosos y células mesenquimatosas de la piel inducidas a partir de células iPS o células ES se pueden usar como células mesenquimatosas y células epiteliales de piel naciente y células epiteliales de glándula sudoríparas inducidas a partir de células iPS o células ES se pueden usar como células epiteliales. Asimismo, cuando se produce un germen de glándula salival regenerativo, células mesenquimatosas de un germen de glándula salival naciente o células mesenquimatosas de glándula salival inducidas a partir de células iPS o células ES se pueden usar como células mesenquimatosas, y células epiteliales de una parte intercalada de glándula salival y células epiteliales de glándula salival inducidas a partir de células iPS o células ES se pueden usar como células epiteliales. Asimismo, cuando se produce un germen de glándula lagrimal regenerativo, células mesenquimatosas de un germen de glándula lagrimal naciente o células mesenquimatosas de glándula lagrimal inducidas a partir de células iPS o células ES se pueden usar como células mesenquimatosas, y células epiteliales de un germen de glándula lagrimal naciente y células epiteliales de glándula lagrimal inducidas a partir de células iPS o células ES se pueden usar como células epiteliales.

Asimismo, el órgano del cual se toman las células mesenquimatosas y las células epiteliales conservan preferentemente la capacidad de regenerarse en un cuerpo adulto normal desde la perspectiva de la juvenilidad y la homogeneidad en la etapa de diferenciación celular. Asimismo, también se puede usar un órgano que haya sido equipado con la capacidad de regenerarse mediante una operación quirúrgica artificial, administración de fármacos o introducción de genes.

Las células derivadas de otro tejido mesenquimatoso *in vivo* también pueden usarse como células mesenquimatosas derivadas de algún lugar distinto del órgano que es la diana de regeneración. Preferentemente, dichas células son células de la médula ósea que no incluyen células sanguíneas o células mesenquimatosas, y aún más preferentemente células mesenquimatosas de la cavidad bucal, células de la médula ósea del hueso de la mandíbula, células mesenquimatosas derivadas de células de la cresta neural craneal, células precursoras mesenquimatosas o células madre de las mismas que pueden diferenciarse en dichas células mesenquimatosas, y similares. La bibliografía de patentes 3 describe un ejemplo en el que se usan células derivadas de amnios como células mesenquimatosas, y la bibliografía de patentes 4 describe un ejemplo en el que se usan células obtenidas mediante inducción por diferenciación de células madre totipotentes, como las células mesenquimatosas.

Las células derivadas de otro tejido epitelial *in vivo* también pueden usarse como células epiteliales derivadas de algún lugar distinto del órgano que es la diana de regeneración. Preferentemente, dichas células son células epiteliales de la piel o de membranas mucosas y encías en la cavidad bucal, y más preferentemente son células precursoras epiteliales inmaduras, por ejemplo, células epiteliales no queratinizadas o células madre de las mismas que pueden diferenciarse en células epiteliales que se han diferenciado, por ejemplo, queratinizadas o paraqueratinizadas, tales como la piel o las membranas mucosas o similares. La bibliografía de patente 2 describe un ejemplo en el que se usan células epiteliales de la cavidad bucal o células cultivadas primarias de las mismas como células epiteliales. Desde la perspectiva del uso de tejido autógeno, es preferible usar células mesenquimatosas y células epiteliales o tejido que incluye estas células de la diana de trasplante.

Las células mesenquimatosas y las células epiteliales o tejidos que incluyen estas células para producir el germen de órgano regenerativo se pueden recoger de mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos, monos, etc.) y ungulados (por ejemplo, cerdos, vacas, caballos, etc.), pequeños mamíferos tales como roedores (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, etc.), así como diversos otros animales tales como perros y gatos. La recogida de células mesenquimatosas y células epiteliales o tejidos que incluyen estas células puede llevarse a cabo extrayéndolas en condiciones asépticas y almacenándolas en una solución de almacenamiento apropiada, mientras se aplican las condiciones normalmente usadas para la recogida de tejidos sin cambios.

Las células mesenquimatosas y las células epiteliales del órgano (incluyendo un tejido que pertenece al órgano) que es la diana de regeneración se preparan, por ejemplo, separando primero el órgano (incluyendo un tejido que pertenece al órgano) que se ha aislado del tejido circundante en un tejido mesenquimatoso y un tejido epitelial de acuerdo con su forma. Al hacer esto, se puede usar una enzima para facilitar la separación. Como enzima, se pueden

5 mencionar enzimas conocidas tales como dispasa, colagenasa y tripsina, y los expertos en la materia pueden usar una enzima apropiada de su elección.

Un agregado celular en la presente invención significa una agregación de células derivadas de un tejido mesenquimatoso o un tejido epitelial, y puede prepararse agregando células obtenidas dispersando un tejido

10 mesenquimatoso o un tejido epitelial en células discretas o agregando células obtenidas por cultivo primario o subcultivo de dichas células.

Con fin de dispersar las células, se puede usar una enzima tal como dispasa, colagenasa y tripsina. Cuando se realiza un cultivo primario o subcultivo de células dispersas antes de preparar un agregado celular para obtener un número

15 suficiente de células, se puede usar un medio que generalmente se usa para cultivar células animales tal como el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) como medio para el cultivo. Se puede añadir suero para promover el crecimiento celular, o como una alternativa al suero, por ejemplo, se puede añadir un factor de crecimiento celular tal como FGF, EGF y PDGF o un componente sérico conocido, tal como transferrina. Cuando se añade suero, la concentración se puede modificar de manera apropiada dependiendo del estado del cultivo en el momento de la

20 adición, pero normalmente se puede establecer en aproximadamente el 10 %. Para el cultivo celular, se aplican condiciones de cultivo normales, por ejemplo, cultivo en una incubadora que tiene una concentración de CO₂ del 5 % a una temperatura de aproximadamente 37 °C. Además, un antibiótico como estreptomycin también se puede añadir según sea apropiado.

Con el fin de añadir células, por ejemplo, se puede centrifugar una suspensión celular. En un agregado celular de células mesenquimatosas y células epiteliales, las células respectivas están preferentemente en un estado de alta densidad con el fin de garantizar que las células interactúen de manera fiable entre sí cuando se ponen en contacto estrecho. Un estado de alta densidad significa un grado de densidad equivalente al de la constitución de un tejido, por

30 ejemplo 5×10^7 células/ml a 1×10^9 células/ml, preferentemente 1×10^8 células/ml a 1×10^9 células/ml, y de la forma más preferentemente 2×10^8 células/ml a 8×10^8 células/ml. El método para lograr una alta densidad del agregado celular no está particularmente limitado, pero, por ejemplo, se puede lograr mediante un método en el que las células se agregan por centrifugación y después se precipitan. Se prefiere la centrifugación porque puede alcanzar fácilmente una alta densidad sin comprometer la actividad de las células. La centrifugación se puede llevar a cabo durante de 3 a 10 minutos en el número de rotaciones que proporciona una fuerza centrífuga de $300 \times g$ a $1200 \times g$, y

35 preferentemente de $500 \times g$ a $1000 \times g$. Si la centrifugación es menor de $300 \times g$, la densidad celular tiende a no alcanzar un nivel suficientemente alto, mientras que si la centrifugación es mayor de $1200 \times g$, las células pueden resultar dañadas.

Cuando se prepara un agregado celular de alta densidad mediante centrifugación, normalmente se prepara una suspensión celular en un recipiente tal como un tubo usado para la centrifugación de células y después las células se centrifugan. Tras la centrifugación, las células permanecen como un precipitado y se retira la mayor cantidad posible del sobrenadante. En este momento, la cantidad de componentes distintos de las células diana (por ejemplo, solución de cultivo, tampón, etc.) es preferentemente igual o menor que la capacidad de las células, y de la manera más

45 se ponen en contacto estrecho dentro de un portador de soporte mediante un método que se explicará a continuación, las células establecen contacto estrecho entre sí y la interacción célula-célula se exhibe de manera efectiva.

El portador de soporte no está particularmente limitado siempre que el cultivo celular pueda llevarse a cabo en él. Por ejemplo, se prefieren los portadores de soporte gelificados, fibrosos y en estado sólido. Al usar dicho portador de

50 soporte, se puede prevenir aún más la presión excesiva sobre el germen de órgano regenerativo *in vivo*.

Como portador de soporte que se usará en la presente invención, se pueden mencionar, por ejemplo, colágeno, gel de agarosa, carboximetilcelulosa, gelatina, agar, hidrogel, Cell Matrix (nombre del producto), Mebiol Gel (nombre del producto), Matrigel (nombre del producto), elastina, fibrina, laminina, mezcla de matriz extracelular, ácido poliglicólico (APG), ácido poliláctico (APL), copolímero de ácido láctico/ácido glicólico (PLGA), y similares. Entre otros, se prefieren

55 colágeno, gel de agarosa, carboximetilcelulosa, gelatina, agar, hidrogel, Cell Matrix, Mebiol Gel, Matrigel, mezcla de matriz extracelular, elastina, fibrina y laminina, que tienen la dureza y la capacidad de retención apropiadas.

Por ejemplo, se puede usar un portador de soporte líquido curando después de disponer el germen de órgano regenerativo en él. Por ejemplo, preparando una gota de gel de colágeno en una placa de cultivo, disponiendo el germen de órgano regenerativo en la gota de colágeno y después cultivando en una incubadora de CO₂ a 37 °C, el colágeno puede gelificarse.

60 El portador de soporte usado con el fin de cultivar las primera y segunda masas celulares preferentemente tiene una capacidad de retención suficiente para retener el estado de contacto estrecho de las masas celulares sin dispersión de las células. En el presente documento, el "estado de contacto estrecho" significa un estado en el que las masas

65 El portador de soporte usado con el fin de cultivar las primera y segunda masas celulares preferentemente tiene una capacidad de retención suficiente para retener el estado de contacto estrecho de las masas celulares sin dispersión de las células. En el presente documento, el "estado de contacto estrecho" significa un estado en el que las masas

celulares de alta densidad de células mesenquimatosas y células epiteliales descritas anteriormente mantienen una densidad igualmente alta incluso cerca de la superficie de contacto entre las células mesenquimatosas y las células epiteliales. Si el portador de soporte capaz de retener un estado de contacto estrecho es, por ejemplo, colágeno, se puede proporcionar una dureza adecuada usando el colágeno a una concentración tal que la concentración final sea de 2 mg/ml a 3 mg/ml, o en otras palabras una concentración tal que la resistencia de la gelatina sea de 120 g a 250 g de acuerdo con un método *mutatis mutandis* de acuerdo con JIS-K6503-1996 (medida como una carga necesaria para hundir un émbolo de 12,7 mm de diámetro 4 mm). Se pueden usar preferentemente otros tipos de portadores de soporte como portadores de soporte de la presente invención siempre que tengan una resistencia equivalente de acuerdo con un método de evaluación equivalente. Asimismo, un portador de soporte que tiene una dureza correspondiente a la resistencia de la gelatina deseada se puede obtener mezclando uno o más tipos de portadores de soporte.

El método para disponer las primera y segunda masas celulares en el portador de soporte no está particularmente limitado. Si las masas celulares son agregados celulares, por ejemplo, un precipitado obtenido por centrifugación como se ha descrito anteriormente se puede disponer insertándolo en el portador de soporte con una microjeringa o similar. Si las masas celulares son un tejido, pueden disponerse en una ubicación arbitraria en el portador de soporte usado la punta de una aguja de jeringa o similar.

El método para disponer las primera y segunda masas celulares en contacto estrecho en el portador de soporte en la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, las masas celulares pueden ponerse en contacto estrecho disponiendo una de las masas celulares en el portador de soporte y después disponiendo la otra masa celular para que presione contra la primera masa celular. Más específicamente, una de las masas celulares puede presionarse contra la otra masa celular cambiando apropiadamente la posición de la punta de la aguja de la jeringa anterior en el portador de soporte. Cuando se usa un tejido epitelial o un tejido mesenquimatoso como masas celulares, es preferible disponer la superficie del tejido epitelial o tejido mesenquimatoso en la que el tejido ha estado en contacto con el tejido mesenquimatoso o tejido epitelial, respectivamente, en el órgano original (incluyendo un tejido que pertenece al órgano) de modo que que contacte con la otra masa celular.

También es preferible incluir la solidificación del portador de soporte después de disponer las masas celulares. De este modo, las células se agregan más y se puede lograr un estado de densidad aún mayor. Por ejemplo, cuando se usa gel de colágeno, se puede solidificar dejándolo reposar durante de varios minutos a varias decenas de minutos a la temperatura del cultivo. En este momento, cuanto menos componentes, aparte de las células, haya en las masas celulares, mayor densidad se puede obtener.

La duración del cultivo difiere dependiendo del número de células dispuestas dentro del portador de soporte, el estado de las masas celulares, las condiciones de cultivo, el tipo de animal y similares, y la duración se puede ser elegida apropiadamente por un experto en la materia. La duración del cultivo también se puede modificar apropiadamente dependiendo del órgano que es la diana de regeneración.

Al aumentar la duración del cultivo, la formación del germen de órgano regenerativo puede progresar aún más. Con el fin de obtener una condición deseada, por ejemplo, el cultivo se puede llevar a cabo durante 6 días o más, 30 días o más, 50 días o más, 100 días o más, o 300 días o más, y el medio y las condiciones de cultivo se pueden cambiar durante el cultivo.

Por ejemplo, cuando se trasplanta un germen de folículo piloso regenerativo, para obtener pelo funcional, el germen de folículo piloso regenerativo se cultiva preferentemente durante al menos un día, y más preferentemente se cultiva 2 o más días.

Cuando se trasplanta un germen de glándula salival regenerativo o un germen de glándula lagrimal regenerativo para obtener una glándula salival o glándula lagrimal funcional, el germen de glándula salival regenerativo o el germen de glándula lagrimal regenerativo se cultiva preferentemente durante al menos un día, y más preferentemente se cultiva 2 o más días.

Para el proceso de cultivo dentro del portador de soporte, un portador de soporte que incluye las primera y segunda masas celulares puede cultivarse solo o cultivarse en presencia de otras células animales o similares.

Cuando se cultiva el portador de soporte solo, condiciones que se usan generalmente para el cultivo de células animales se pueden usar como condiciones de cultivo. Se puede añadir suero derivado de mamíferos al cultivo, y también se pueden añadir diversos factores celulares que se sabe que son eficaces en la proliferación o diferenciación de dichas células. Los ejemplos de dichos factores celulares pueden incluir FGF, BMP y similares.

Desde la perspectiva del intercambio de gases y el suministro de nutrientes a las masas celulares, y desde la perspectiva de poder realizar todas las etapas *in vitro* sin contacto/contaminación con otras células animales, el cultivo dentro del portador de soporte es preferentemente un cultivo de órganos. En un cultivo de órganos, el cultivo generalmente se lleva a cabo haciendo flotar una membrana porosa en un medio adecuado para el crecimiento de células animales y después colocando el portador de soporte que incluye las primera y segunda masas celulares en

la membrana. La membrana porosa usada en el presente documento tiene preferentemente muchos poros de aproximadamente 0,3 a 5 μm , y se puede mencionar, por ejemplo, Cell Culture Insert (nombre del producto) e Isopore Filter (nombre del producto).

- 5 Después de construir el germen de órgano regenerativo a partir de células epiteliales y células mesenquimatosas como se ha descrito anteriormente, se inserta una guía en el germen de órgano regenerativo.

La "guía" usada en la presente invención puede insertarse en un germen de órgano regenerativo durante el cultivo construido a partir de un cultivo de órganos y facilitar la conexión entre una parte del lado de la célula epitelial del germen de órgano regenerativo y las células epiteliales del lado del receptor después del trasplante del germen de órgano regenerativo. La guía usada en la presente invención es una fibra hecha de un polímero tal como el nailon o un polímero bioabsorbible sintético o natural, una fibra metálica tal como acero inoxidable, una fibra de carbono, una fibra química tal como una fibra de vidrio y una fibra animal o vegetal natural. Más específicamente, se puede mencionar un hilo de nailon, un alambre de acero inoxidable o similar. En particular, cuando se usa una guía para el germen de folículo piloso regenerativo, se puede usar como guía pelo derivado de un cuerpo vivo. La guía usada en la presente invención puede asumir la forma de un hilo hueco. El diámetro y la longitud de la guía pueden diseñarse de manera apropiada dependiendo del órgano que es la diana de regeneración. Por ejemplo, en cuanto a una guía usada para un germen de folículo piloso regenerativo, su diámetro es preferentemente de 5 a 100 μm , y más preferentemente de 20 a 50 μm . Asimismo, en cuanto a una guía usada para un germen de folículo piloso regenerativo, su longitud es preferentemente de 1 a 10 mm, y más preferentemente de 4 a 6 mm.

Asimismo, si es necesario insertar la guía en un conducto del lado del receptor durante el trasplante como en el caso de un germen de glándula salival regenerativo, por ejemplo, el diámetro de la guía es preferentemente de 5 a 60 μm , y más preferentemente de 20 μm a 40 μm . Asimismo, la longitud de la guía es preferentemente de 1 mm a 6 mm, y más preferentemente de 2 mm a 3 mm. Además, la superficie de la guía es preferentemente lisa, de modo que se puede insertar fácilmente en el conducto, y la guía preferentemente conserva un grado de dureza que no daña el tejido. Como una guía de este tipo, un material de monofilamento es preferible a un material de multifilamento, tal como una trenza.

La guía se inserta desde el lado de la célula epitelial del agrupamiento de células que se convierte en el germen de órgano regenerativo, de modo que la estructura de la masa celular que se convierte en el germen de órgano regenerativo, particularmente la superficie de contacto entre las células epiteliales y las células mesenquimatosas, no resulte dañada por la inserción de la guía, y la guía penetra verticalmente a través de la fracción de células epiteliales y la fracción de células mesenquimatosas.

Asimismo, la guía puede insertarse en el agrupamiento de células que se convierte en el germen de órgano regenerativo inmediatamente después del inicio del cultivo de órganos, en otras palabras, justo después de disponer las masas celulares de células epiteliales y células mesenquimatosas en el medio. Asimismo, dado que la resistencia de las células epiteliales de un germen de folículo piloso regenerativo aumenta debido a la adhesión celular durante el cultivo de órganos, la penetración de la guía puede incrementarse usando un material fuerte para la guía (tal como un alambre de acero inoxidable o similar) y afilando la punta de la guía y similares, permitiendo que la guía se inserte 1 o 2 días después del comienzo del cultivo. La guía se inserta preferentemente inmediatamente después de la preparación del germen de órgano porque en este momento se puede usar un material flexible con baja reacción a cuerpos extraños en un cuerpo vivo, tal como un hilo de nailon.

Asimismo, después de insertar la guía en el germen de órgano regenerativo, el germen de órgano regenerativo puede cultivarse en un estado en el que se ha insertado la guía. La duración del cultivo después de la inserción de la guía se puede establecer de manera apropiada dependiendo del órgano que es la diana de regeneración. Por ejemplo, cuando se produce un germen de folículo piloso regenerativo, el cultivo se lleva a cabo preferentemente durante de 1 a 4 días, y más preferentemente de 1,5 a 2 días. Al cultivar durante 2 días después de la inserción de la guía, la adhesión entre la guía y el órgano regenerativo se vuelve fuerte, y esto ayuda a prevenir cualquier desviación que pueda ocurrir durante el trasplante. Asimismo, es preferible cultivar después de haber insertado la guía porque el germen de órgano regenerativo en el lado de las células epiteliales puede alargarse a lo largo de la guía. Este alargamiento puede mejorar la eficacia y la estabilidad de la adhesión autónoma entre la parte del lado de las células epiteliales del germen de órgano regenerativo y las células epiteliales del receptor después del trasplante del germen de órgano regenerativo.

Asimismo, de acuerdo con otra realización de la presente invención, el germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante producido mediante el método de producción de la presente invención se puede trasplantar a un sitio diana.

El germen de órgano regenerativo para trasplante en el que se ha insertado la guía se puede trasplantar a un sitio diana mediante un método conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, cuando se trasplanta un germen de folículo piloso regenerativo, este se puede trasplantar usando un trasplante capilar que utiliza la técnica de trasplante capilar Shapiro o el dispositivo de trasplante capilar Choi o un implantador que utiliza presión neumática o similar. La técnica de trasplante capilar de Shapiro es un método mediante el cual se crea una herida de injerto en el sitio del trasplante con un microbisturí o similar y después se trasplanta el trasplante capilar con unas pinzas. Cuando se aplica

este tipo de técnica de trasplante capilar, dado que el germen de órgano regenerativo para trasplante proporcionado por la presente invención tiene una guía, es posible operar sin tocar directamente el germen de folículo piloso regenerativo recogiendo la guía y, por lo tanto, la operación se puede realizar fácilmente.

- 5 La profundidad de trasplante del germen de órgano regenerativo puede modificarse de manera apropiada dependiendo del órgano que es la diana de regeneración. Por ejemplo, cuando se trasplanta un germen de folículo piloso regenerativo, la profundidad es preferentemente de 0,05 a 5 mm, más preferentemente de 0,1 a 1 mm, y de la forma más preferente de 0,3 a 0,5 mm. En particular, cuando se trasplanta un germen de folículo piloso regenerativo a un receptor, preferentemente se trasplanta a la capa dérmica, y más preferentemente por encima de la superficie límite
- 10 entre el tejido dérmico y subdérmico en el que la formación del folículo piloso y la posterior eficacia de crecimiento del cabello son excelentes. También es preferible ajustar la profundidad de trasplante para que el extremo superior de la parte de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo quede expuesto en el extremo superior de la herida de injerto, ya que esto puede aumentar la continuidad con las células epiteliales del receptor.
- 15 Asimismo, por ejemplo, cuando se trasplanta un germen de órgano para el cual es necesario insertar la guía en un conducto del lado del receptor, tal como cuando se trasplanta un germen de glándula salival regenerativo, es preferible conservar el conducto del lado del receptor durante mucho tiempo porque esto puede evitar que la guía se caiga después del trasplante. Asimismo, desde la perspectiva de mejorar el suministro de nutrientes, es preferible que el sitio de trasplante esté cerca de una vena grande. Al hacerlo, el sitio de trasplante se vuelve más fácil de ajustar si el
- 20 conducto del lado del receptor se conserva durante mucho tiempo.

Asimismo, después del trasplante del germen de órgano regenerativo, la guía puede fijarse al sitio diana de trasplante usando una cinta o banda para la unión de la piel, una sutura y similares, de modo que la guía no se caiga.

- 25 Después de que la continuidad entre las células epiteliales del lado del receptor y el lado derivado de las células epiteliales del germen de órgano regenerativo se haya asegurado algún tiempo después del trasplante del germen de órgano regenerativo, la guía puede retirarse del sitio de trasplante. La sincronización para la retirada de la guía se puede establecer de manera apropiada dependiendo del germen de órgano regenerativo. Por ejemplo, cuando se trasplanta un germen de folículo piloso regenerativo, la guía se retira preferentemente del sitio de trasplante de 3 a 7
- 30 días después del trasplante. La guía también se puede dejar para que se caiga de forma natural del sitio de trasplante. Se puede dejar que una guía de un material bioabsorbible se caiga de forma natural del sitio de trasplante o hasta que se descomponga o se absorba. En particular, cuando la guía se incrusta debajo de la piel del receptor junto con el germen de órgano regenerativo después del trasplante, tal como en el caso de un germen de glándula salival regenerativo, es preferible usar una guía bioabsorbible.

- 35 De esta manera, al equipar el germen de órgano regenerativo para trasplante con una guía, las células derivadas de células epiteliales del germen de órgano regenerativo se alargan a lo largo de la guía. De este modo, se puede mejorar la continuidad entre las células epiteliales del lado del receptor y el lado de las células epiteliales del germen de órgano regenerativo después del trasplante. En particular, cuando la guía se mantiene fuera de la epidermis en el sitio de
- 40 trasplante, tal como en el caso de un folículo piloso o glándula sudorípara, la continuidad puede mejorarse aún más porque las células epiteliales del lado receptor se extienden hacia el interior del sitio de trasplante a lo largo de la guía para eliminar sustancias extrañas. También es preferible insertar una guía porque el mantenimiento de la polaridad de las células epiteliales y las células mesenquimatosas se puede mejorar en el germen de órgano regenerativo durante el cultivo. De este modo, se puede aumentar la eficacia de la formación de órganos regenerativos y se puede facilitar la orientación durante el trasplante. En particular, cuando se usa una guía para un germen de folículo piloso regenerativo, la formación del folículo piloso puede estimularse en una dirección deseada, mientras que la continuidad entre el germen de folículo piloso regenerativo y las células epiteliales del lado receptor puede asegurarse. Como resultado, se puede mejorar la eficacia de crecimiento del pelo a partir del germen regenerativo de folículo piloso y es posible controlar la dirección de crecimiento del pelo.

- 50 Los términos usados en la presente memoria descriptiva se usan para explicar las realizaciones específicas descritas en el presente documento, y no pretenden limitar la presente invención.

- 55 Los términos "comprenden/incluyen/contienen" usados en la presente memoria descriptiva pretenden significar que los objetos como se describen (miembros, etapas, elementos, números, etc.) existen excepto cuando otro entendimiento de los mismos es explícito en el contexto, y dichos términos no excluyan la existencia de otros objetos (miembros, etapas, elementos, números, etc.).

- 60 A menos que se proporcione una definición diferente, todos los términos usados en el presente documento (incluyendo los términos técnicos y los científicos) tienen el mismo significado que aquellos ampliamente entendidos por los expertos en la materia en el campo técnico al que pertenece la presente invención. A menos que se proporcione explícitamente una definición diferente, los términos usados en el presente documento deben interpretarse con un significado que sea coherente con el significado en la presente memoria descriptiva y el campo técnico relacionado, y no deben idealizarse ni interpretarse con un significado excesivamente formal.

- 65 Algunas de las realizaciones de la presente invención se han explicado en referencia a diagramas esquemáticos, pero

los diagramas esquemáticos pueden ser exagerados con el fin de aclarar la explicación.

Los términos "primero", "segundo" y similares se usan para expresar diversos elementos en el presente documento, pero se entiende que estos elementos no están limitados por dichos términos. Estos términos se usan solo para distinguir un elemento de otro, y, por ejemplo, el elemento etiquetado como "primero" se puede etiquetar como "segundo" y, de manera similar, el elemento etiquetado como "segundo" se puede etiquetar como "primero" sin alejarse del alcance de la presente invención.

La presente invención se explicará ahora con más detalle a continuación haciendo referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención puede materializarse mediante diversos aspectos y no debe considerarse limitada a los ejemplos descritos en el presente documento.

[Ejemplos]

(I. Producción de folículo piloso regenerativo)

1. Materiales y métodos

(1) Animales experimentales

Los folículos pilosos se recogieron de un ratón C57BL/6 (CLEA Japón) y un ratón C57BL/6 6-TgN (act-EGFP) a las 7 a 8 semanas de edad. Asimismo, la piel que contenía un germen de vello corporal se recogió de un ratón (SLC) C57BL/6 6-TgN (act-EGFP) a la edad gestacional de 18,0 a 18,5 días. Asimismo, un germen de folículo piloso regenerativo producido mediante el método experimental descrito a continuación se trasplantó a un ratón Balb/c nu/nu (SLC) a las 6 a 8 semanas de edad. El cuidado y la experimentación de los animales se realizó bajo la aprobación de la Junta de Ética de Experimentación con Animales de la Universidad de Ciencias de Tokio, en cumplimiento de las leyes, ordenanzas ministeriales y directrices relacionadas.

(2) Cultivo de células papilares pilosas

Después de sacrificar un ratón C57BL/6 EGFP por dislocación cervical, se recogieron todas las capas de la piel bucal y el tejido subcutáneo para no dañar los bulbos pilosos. Después de la extirpación del tejido subcutáneo que rodea los bigotes laterales, se aislaron los folículos pilosos. Se seleccionó un folículo piloso de bigotes laterales en las fases de crecimiento I a IV, y se le retiró la vaina de colágeno usando una aguja de inyección 25G para exponer el folículo piloso. El bulbo piloso se aisló para extraer la papila pilosa. El folículo piloso extraído y la papila pilosa se conservaron en un medio DMEM (DMEM10) que contenía un 10 % de suero bovino fetal y un 1 % de solución de penicilina-estreptomicina. La papila pilosa aislada se sembró en una placa de cultivo de plástico de 3,5 cm (Nippon Becton Dickinson), y el cultivo primario se realizó en un ambiente de CO₂ al 5 %, 37 °C y 95 % de humedad en DMEM10 que contenía 10 ng/ml de FGF2 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Después de cultivar durante 9 días mientras se intercambiaba el medio en el 4º y 8º día, se usaron las células papilares pilosas cultivadas primarias. Las células papilares pilosas cultivadas primarias se lavaron 3 veces con PBS (-), se extirparon con solución de EDTA 10 mM (GIBCO) que contenía tripsina al 0,05 %, se neutralizaron con tripsina en DMEM10, se lavaron suficientemente y después se conservaron a temperatura de hielo hasta el momento de su uso.

(3) Adquisición de células epiteliales del abultamiento del folículo piloso

A partir del tejido de bigotes laterales extraído, la vaina de colágeno se retiró con una aguja de inyección de 25G y el tejido se subdividió en la región del abultamiento. El tejido de la región del abultamiento se hizo reaccionar durante cuatro minutos a 37 °C en una solución de Dispasa II (Becton Dickinson) que tenía una concentración final de 4,8 U/ml y 100 U/ml de collagenasa (Worthington, Lakewood, NJ). Posteriormente, el tejido de la región del abultamiento se aisló quirúrgicamente en un tejido epitelial de la región del abultamiento y un tejido mesenquimatoso alrededor del abultamiento usando una aguja de inyección de 25G. El tejido epitelial aislado de la región del abultamiento se sometió a un tratamiento enzimático de 1 hora en una incubadora con tripsina al 0,05 % (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) y después se hizo pasar a través de un filtro de células de poros de 35 µm para obtener células unificadas. Las células papilares pilosas cultivadas obtenidas en (2) también se recogieron con tripsina al 0,05 % (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) y después se hizo pasar a través de un filtro de células de poros de 35 µm para obtener células unificadas.

(4) Producción de germen de folículo piloso regenerativo y cultivo de órganos

Se produjo un germen de folículo piloso regenerativo mediante el método de germen de órgano. Los procedimientos detallados fueron los siguientes. Las células de la región del abultamiento unificadas derivadas del tejido epitelial de la región del abultamiento y las células papilares pilosas cultivadas obtenidas como se ha descrito anteriormente se transfirieron individualmente a microtubos de 1,5 ml (Eppendorf) recubiertos con grasa de silicona, y después se recogieron como precipitados por centrifugación. El sobrenadante en la solución de cultivo después de la centrifugación se eliminó por completo con puntas GELoader Tip 0,5-20 ml (Eppendorf). A continuación, se preparó una gota de gel de colágeno dejando gotear 30 ml de Cellmatrix tipo I-A (Nitta Gelatin, Osaka, Japón) en una placa de

Petri recubierta con grasa de silicona (Dow Coming Toray). Aproximadamente 0,2 ml de las células papilares pilosas cultivadas preparadas como se ha descrito anteriormente se inyectaron en la gota de gel de colágeno usando una punta de pipeta de 0,1 a 10 ml (Quality Scientific Plastics) para producir un agregado celular. A continuación, se inyectaron aproximadamente 0,2 ml de las células epiteliales de la región del abultamiento preparadas como se ha descrito anteriormente en la misma gota de gel usando una punta de pipeta de 0,1 a 10 ml (Quality Scientific Plastics) para contactar estrechamente con el agregado de células papilares pilosas cultivadas, produciendo de este modo un agregado celular de las células papilares pilosas cultivadas y las células epiteliales de la región del abultamiento. Además, desde el lado de las células epiteliales de la región del abultamiento del agregado celular de las células papilares pilosas cultivadas y las células epiteliales de la región del abultamiento, se insertó un hilo de nailon con una longitud total de 5 mm (Matsuda Medical Industry) mientras se confirmaba con un microscopio estereoscópico para penetrar verticalmente a través de la superficie de contacto entre la fracción de células papilares pilosas cultivadas y la fracción de células epiteliales de la región del abultamiento sin dañar la estructura del agregado celular (particularmente la superficie de contacto entre las células epiteliales y las células mesenquimatosas). Posteriormente, la gota de gel se dejó reposar durante 5 minutos a 37 °C para solidificarla, fortaleciendo de este modo aún más la unión entre las células epiteliales y las células mesenquimatosas para producir el germen de folículo piloso regenerativo con una guía.

(5) Adquisición de células epiteliales y mesenquimatosas cutáneas embrionarias

La piel dorsal se recogió de un embrión de ratón EGFP a los 18,0 a 18,5 días de edad gestacional, y la capa epitelial y la capa dérmica se separaron realizando un tratamiento con dispasa en condiciones de 1 hora, 4 °C y 55 rpm de agitación basándose en una modificación parcial del método descrito por Nakao et al. (Nakao K. et al, Nat. Methods, 4(3), 227-30, 2007). La capa dérmica se sometió adicionalmente a dos tratamientos con 100 unidades/ml de colagenasa I durante 40 minutos a 37 °C, y después se sometió a un tratamiento de unificación para obtener las células mesenquimatosas. La capa epitelial también se sometió a dos tratamientos con 100 unidades/ml de colagenasa I durante 40 minutos a 37 °C, y después se retiraron las células mesenquimatosas mezcladas en ella, seguido de tratamiento durante 10 minutos a 37 °C en una solución de tripsina al 0,25 % que contenía 100 unidades/ml de colagenasa I y después un tratamiento de unificación para obtener las células epiteliales.

Asimismo, se produjo un agregado celular de células mesenquimatosas cutáneas embrionarias y células epiteliales cutáneas embrionarias dotado de una guía mediante un método similar al descrito anteriormente (4), en el que las células mesenquimatosas cutáneas embrionarias se inyectaron en la gota de gel de colágeno de las células papilares pilosas cultivadas y después las células epiteliales cutáneas embrionarias se inyectaron en la gota de gel de colágeno en lugar de las células de la región del abultamiento para contactar estrechamente con el agrupamiento de células mesenquimatosas cutáneas embrionarias.

El agregado celular de las células epiteliales y las células mesenquimatosas producido en el gel se transfirió junto con el gel de colágeno a un Cell Culture Insert (Becton Dickinson) con un tamaño de poro de 0,4 µl, en el cual se había colocado una placa de 6 pocillos (Becton Dickinson) a la que se le añadió 1 ml de DMEM10, y después se sometió a cultivo de órganos durante 2 días en condiciones de 37 °C, CO₂ al 5 %, y 95 % de humedad para producir un germen de folículo piloso regenerativo.

(6) Trasplante de germen de folículo piloso regenerativo en piel de ratón lampiño

El germen de folículo piloso regenerativo producido a partir de células epiteliales cutáneas embrionarias y las células mesenquimatosas cutáneas embrionarias, y el germen de folículo piloso regenerativo producido a partir de las células epiteliales de la región del abultamiento y las células papilares pilosas cultivadas derivadas de un bigote de adulto se trasplantaron en la piel de ratón lampiño como se describe a continuación.

Un ratón lampiño fue anestesiado con pentobarbital de acuerdo con un método convencional, y se colocó en una posición reclinada natural después de desinfectar su limo con isodina. El ratón se perforó utilizando un microbisturí V-lance (Alcon Japan) para formar una herida de injerto desde la capa epidérmica de la piel hasta la parte de la capa inferior de la capa dérmica. La herida de injerto se extendió desde la superficie del cuerpo hasta una profundidad de aproximadamente 400 µm en la dirección vertical y aproximadamente 1 mm en la dirección horizontal. El gel de colágeno se retiró del germen de folículo piloso regenerativo en el que se insertó una guía hecha de hilo de nailon (correspondiente al hilo de sutura de nailon 8-0, de aproximadamente 5 mm de longitud), y se insertó el germen de folículo piloso regenerativo usando pinzas acuminadas N.º 5 (Natsume Seisakusho) de modo que el componente de células epiteliales estaba orientado hacia el lado de la superficie corporal de la herida de injerto. La profundidad de trasplante se ajustó de modo que el extremo superior del componente de células epiteliales del germen de folículo piloso regenerativo se expusiera en el extremo superior de la herida de injerto, y el germen de folículo piloso regenerativo se situó de modo que la guía del hilo de nailon se expusiera en la superficie del cuerpo. La guía del hilo de nailon se fijó con una tira Steritest (3M) a la superficie de la piel cerca de la herida de injerto, y después la herida de injerto se protegió con Nurseban y cinta quirúrgica (3M). La cinta protectora se retiró 5 a 7 días después del trasplante, y la guía del hilo de nailon se dejó en el sitio de trasplante. Cuando la guía del hilo de nailon permanecía después de un día más, se retiró. El injerto del trasplante se determinó visualmente o con un estereomicroscopio de fluorescencia, y después se observó el sitio de trasplante a lo largo del tiempo.

(7) Observación del crecimiento del pelo a lo largo del tiempo y análisis histológico

El sitio de trasplante del germen de folículo piloso regenerativo se observó visualmente y con un estereomicroscopio de fluorescencia para evaluar el crecimiento del pelo. Después de que el pelo comenzó a crecer, se evaluó el crecimiento y la regresión del pelo a través de fotografías periódicas. El tejido extraído se fijó con Mildform 10N (Wako Pure Chemicals) y después se realizó un bloqueo mediante inclusión en parafina o congelación de acuerdo con un método convencional. Se prepararon secciones sucesivas y se sometieron a tinción con HE o tinción nuclear fluorescente de Hoechst para el análisis histológico.

2. Resultados

(1) Crecimiento del pelo mediante trasplante intracutáneo de un germen de folículo piloso regenerativo

Con el fin de analizar la ubicación de trasplante de un germen de folículo piloso regenerado que se trasplantó por vía intracutánea, se preparó un germen de folículo piloso regenerativo a partir de células cutáneas de un ratón a los 18,5 días de edad gestacional y después se trasplantó en la piel de un ratón lampiño. La piel se extrajo después del trasplante y se preparó una sección en parafina de la misma y se tiñó con HE. Como resultado, se determinó que la ubicación del trasplante estaba dentro de la capa dérmica de la piel y se determinó que la profundidad del trasplante estaba, de promedio, a 393 μm de la superficie corporal. Los resultados inmediatamente después del trasplante, 3 días después del trasplante y 10 días después del trasplante se muestran en la figura 2. Como se muestra en la figura 2, cuando el germen de folículo piloso regenerativo se trasplantó en la piel, la guía se fijó en un estado en el que sobresalía de la superficie del cuerpo (la foto en la fila superior del día 0; la flecha indica la guía). Asimismo, durante el trasplante, el germen de folículo piloso regenerativo y el epitelio receptor no estaban conectados (la foto de la sección teñida con HE en la fila inferior del día 0 en la figura 2). El 3° día después del trasplante, el componente epitelial del germen de folículo piloso regenerativo y la capa epidérmica de la piel receptora se conectaron a través de la guía (la foto de la sección teñida con HE en la fila inferior del día 3 en la figura 2; la flecha indica la parte conectada). El 10° día después del trasplante, el folículo piloso se regeneró y el pelo regenerativo comenzó a crecer desde la superficie del cuerpo en el 14° día, de promedio (día 10 en la figura 2) con una frecuencia de crecimiento del pelo del 90 %.

Asimismo, los resultados tras trasplantar un germen de folículo piloso regenerativo derivado de un bigote lateral de adulto en el lomo de un ratón lampiño, de modo que la profundidad del trasplante sea la misma que la descrita anteriormente, se muestran en la figura 4. La figura 4A es una foto que muestra la inserción de la guía en el germen de folículo piloso regenerativo. "E" indica la parte derivada de las células epiteliales de la región del abultamiento, "DP" indica la parte derivada de las células papilares pilosas cultivadas, y "G" indica la guía. La figura 4B muestra una foto que rastrea el sitio de trasplante con un estereomicroscopio de fluorescencia. Después del trasplante del germen de folículo piloso regenerativo derivado de bigote de adulto, el pelo regenerativo comenzó a crecer desde la superficie del cuerpo de promedio 21 días después del trasplante (figura 4C) con una frecuencia de crecimiento del pelo del 74 %.

(2) Análisis tisular del folículo piloso regenerativo

Se extrajo un folículo piloso regenerado y se llevó a cabo el análisis tisular. Los resultados del mismo se muestran en la figura 5. Versiones agrandadas de las partes dentro de los cuadros cuadrados en las imágenes del microscopio de bajo aumento a la izquierda se muestran en las fotos de las columnas central y derecha. El folículo piloso regenerativo se distinguió de los folículos pilosos de ratones lampiños que lo rodeaban usando fluorescencia de GFP (la foto de la parte inferior izquierda en la figura 5). El tejido epitelial del folículo piloso regenerado se conectó a la capa epidérmica de la piel del receptor, y las células derivadas del receptor eran dominantes en la capa basal epidérmica de la parte conectada. Asimismo, en las fotos agrandadas de la parte superior del pelo regenerativo, se confirmó la regeneración de las glándulas sebáceas (la parte marcada con la flecha en las fotos superior e inferior en la columna central en la figura 5). Las glándulas sebáceas derivadas del germen de folículo piloso regenerativo se mezclaron con las derivadas de las células del receptor, pero las glándulas sebáceas debajo de las del folículo piloso regenerativo se derivaron del germen de folículo piloso regenerativo trasplantado. Además, las fotos en el lado derecho en la figura 5 muestran bulbos pilosos. En la foto inferior derecha, ya que se confirmó la fluorescencia de GFP en el sitio de la papila (dérmica) pilosa (DP), se demostró que la papila pilosa se derivó del germen de folículo piloso regenerativo trasplantado. De esta manera, el folículo piloso regenerativo exhibió una estructura de folículo piloso histológicamente normal, y el folículo piloso regenerativo derivado de un bigote lateral de adulto fue claramente más grande que el vello corporal.

(3) Análisis del tallo piloso regenerativo

El pelo regenerativo derivado de un vello corporal embrionario era un 100 % pelo negro, y el pelo regenerativo derivado de un bigote lateral de adulto era un 95,5 % pelo blanco. La figura 6 muestra fotos que representan la observación con un microscopio óptico y un microscopio electrónico de barrido. Se observó una médula en espiral de tallo piloso (M) que es característico del pelo duro similar a un bigote dentro de las líneas discontinuas (figura 6a), y se confirmó una estructura de cutícula equivalente a un bigote lateral normal (figura 6b). De esta manera, el bigote regenerativo exhibió una médula de tallo piloso y una corteza equivalente a los del pelo natural, y también presentó una estructura clara similar a un bigote.

(4) Ciclo capilar del pelo regenerativo

Tras rastrear el crecimiento y la regresión del tallo piloso del bigote regenerativo, el tallo piloso retrocedió a medida que avanzaba el ciclo capilar, y después creció un nuevo tallo piloso desde el sitio del poro en el que cayó el pelo (figura 7). Asimismo, la duración del ciclo capilar fue equivalente a la del ciclo capilar de un bigote natural y no se observaron diferencias significativas (figura 8). A partir de dichos resultados, quedó claro que el pelo regenerativo conservaba su conexión con la capa epidérmica receptora para repetir el crecimiento y la regresión del pelo, incluso si pasa a través del ciclo capilar.

(II. Producción de glándula salival regenerativa)

(1) Producción de germen de glándula salival regenerativo y cultivo de órganos

Se produjo un germen de glándula salival usando el método de germen de órgano para la regeneración de una glándula salival.

Se extrajo quirúrgicamente un germen de glándula submandibular de un feto de ratón C57BL/6 a una edad gestacional de 13,5 a 14,5 días. El germen de glándula submandibular extraído se hizo reaccionar durante 1,5 minutos a 25 °C en una solución de Dispasa II (Becton Dickinson) con una concentración final de 50 U/ml. Posteriormente, el germen de glándula submandibular se aisló en un tejido epitelial de glándula submandibular y un tejido mesenquimatoso de glándula submandibular usando una aguja de inyección de 25G. Además, el tejido mesenquimatoso se sometió a un tratamiento enzimático de 10 minutos en un baño caliente a 37 °C con una solución de collagenasa que tenía una concentración final de 50 U/ml (Worthington, Lakewood, NJ) y una solución de tripsina (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) que tenía una concentración final del 0,25 % y después hizo pasar a través de un filtro de células de poros de 22 µm para obtener células mesenquimatosas completamente unificadas. El tejido epitelial se sometió a dos tratamientos enzimáticos de 15 minutos en un baño caliente a 37 °C con una solución de collagenasa que tenía una concentración final de 100 U/ml (Worthington, Lakewood, NJ), seguido de un tratamiento enzimático de 5 minutos en un baño caliente a 37 °C con una solución de tripsina (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) que tenía una concentración final del 0,25 % y después se hizo pasar a través de un filtro de células de poros de 22 µm para obtener células epiteliales completamente unificadas.

Usando las células epiteliales y las células mesenquimatosas obtenidas, se produjo un germen de glándula salival regenerativo en un gel de colágeno mediante el método de germen de órgano (figura 9). Los procedimientos detallados fueron los siguientes. Las células epiteliales unificadas y las células mesenquimatosas unificadas obtenidas como se ha descrito anteriormente se transfirieron individualmente a microtubos de 1,5 ml (Eppendorf) recubiertos con grasa de silicona y después se centrifugaron. El sobrenadante en la solución de cultivo después de la centrifugación se eliminó por completo con puntas GELoader Tip 0,5-20 ml (Eppendorf), y las células epiteliales unificadas y las células mesenquimatosas unificadas se recogieron respectivamente como precipitados. A continuación, se preparó una gota de gel de colágeno dejando gotear 30 µl de Cellmatrix tipo I-A (Nitta Gelatin, Osaka, Japón) en una placa de Petri recubierta con grasa de silicona (Dow Coming Toray). Aproximadamente 0,3 µl de las células mesenquimatosas unificadas preparadas como se ha descrito anteriormente se inyectaron en la gota de gel de colágeno usando una punta de pipeta de 0,1 a 10 ml (Quality Scientific Plastics) para producir un agregado celular. A continuación, se inyectaron aproximadamente 0,2 µl de las células epiteliales unificadas preparadas como se ha descrito anteriormente en la misma gota de gel usando una punta de pipeta de 0,1 a 10 ml (Quality Scientific Plastics) para contactar estrechamente con el agregado de células mesenquimatosas, produciendo de este modo un agregado celular de las células epiteliales y las células mesenquimatosas derivadas del germen de glándula submandibular.

El agregado celular de las células epiteliales y las células mesenquimatosas derivadas del germen de glándula submandibular producido en el gel se transfirió junto con el gel de colágeno a un Cell Culture Insert (Becton Dickinson) con un tamaño de poro de 0,4 µm, en el cual se había colocado una placa de 6 pocillos (Becton Dickinson) a la que se le añadió 1 ml de DMEM10, y después se sometió a cultivo de órganos en condiciones de 37 °C, CO₂ al 5 %, y 95 % de humedad para producir un germen de glándula salival regenerativo.

Durante el cultivo de órganos del germen de glándula salival regenerativo, se observó que las células epiteliales comenzaron a invaginarse hacia el lado de las células mesenquimatosas 24 horas después del inicio del cultivo (figura 10). Las dos primeras filas de fotos en la figura 10 ilustran el estado en varios tiempos transcurridos cuando una glándula submandibular extraída de un ratón embrionario se sometió a cultivo de órganos tal como está después de la extracción, y las dos filas de fotos de la parte inferior de la figura 10 ilustran el estado en varios tiempos transcurridos cuando un germen de glándula salival regenerativo construido mediante el método de germen de órgano se sometió a cultivo de órganos. Tras el análisis por tinción con hematoxilina-eosina (tinción con HE), se confirmó que las puntas del tejido epitelial invaginado se ramificaron 72 horas después del inicio del cultivo (figura 10).

A partir de los resultados anteriores, se demostró que un germen de glándula salival regenerativo podría producirse usando el método de germen de órgano.

Como se muestra en la figura 9, los primordios de glándula submandibular en diferentes fases de desarrollo se

obtuvieron de un embrión de ratón a una edad gestacional de 13,5 días (consulte las fotos de las etapas temprana, media y tardía en la figura 9). Sin embargo, un germen de glándula salival regenerativo reconstruido a partir de células epiteliales y células mesenquimatosas se pudo producir mediante el método descrito anteriormente a partir de los primordios de glándula submandibular en cada fase de desarrollo.

5

(2) Producción de germen de glándula salival regenerativo con hilo guía

Un hilo bioabsorbible (Gunze Co.) con una longitud total de 3 mm se insertó desde el lado de las células epiteliales en el germen de glándula salival regenerativo producido mediante el método descrito en (1) anteriormente, mientras se confirmaba con un microscopio estereoscópico, para penetrar verticalmente a través de la superficie de contacto entre la parte de células epiteliales y la parte de células mesenquimatosas sin dañar la estructura del germen de glándula salival regenerativo (particularmente la superficie de contacto entre las células epiteliales y las células mesenquimatosas). Después de la inserción de la guía, el germen de glándula salival regenerativo se sometió al cultivo de órganos durante 60 horas.

15

Como resultado, se observó que después de aproximadamente 24 horas desde el inicio del cultivo de órganos, el lado de las células epiteliales del germen de glándula salival regenerativo comenzó a moverse/alargarse a lo largo del hilo guía, y después de 60 horas desde el inicio del cultivo, se exhibió una estructura similar a un conducto (figura 11; las flechas en las fotos en la fila más inferior indican la estructura similar a un conducto).

20

(3) Trasplante de germen de glándula salival regenerativo a la parte de conducto de la glándula parótida

La parte acinosa de una glándula parótida de un ratón adulto se extirpó quirúrgicamente para exponer la parte de conducto conectada a la glándula parótida. A continuación, el germen de glándula salival regenerativo con una guía producido mediante el método descrito en (2) anteriormente y sometido a cultivo de órganos durante dos días se trasplantó a la parte de conducto de la glándula parótida junto con el gel de colágeno. Durante el trasplante, la posición del hilo guía se ajustó de modo que la superficie cortada del conducto y el tejido epitelial del germen de glándula salival regenerativo estuvieran próximos entre sí, y la guía se insertó en el conducto de la glándula parótida del lado del receptor. Asimismo, el gel de colágeno que incluye el germen de glándula salival regenerativo y el masetero se suturaron entre sí con hilo de sutura de nailon 8-0 (Bear Medic, Chiba, Japón) para que el germen de glándula salival regenerativo trasplantado no se moviera (figura 12).

30

El germen de glándula salival regenerativo se evaluó histológicamente mediante tinción con HE 30 días después del trasplante. A partir de las imágenes teñidas con HE, se confirmaron células de conducto y células similares a células acinosas serosas similares a las de una glándula submandibular natural en el germen de glándula salival regenerativo (figura 13; las flechas en las fotos en la fila inferior en la figura 13 indican células similares a células acinosas serosas).

35

De esta manera, se pudo reconstruir una glándula salival mediante el método del germen de órgano regenerativo. También fue posible reconstruir una glándula submandibular incluso a partir de un germen de glándula salival regenerativo derivado de una glándula submandibular en un sitio de glándula parótida, que es otra glándula salival.

40

(4) Evaluación de la vía secretora salival de la glándula salival regenerativa

Con el fin de aclarar que el germen de glándula salival regenerativo derivada de glándula submandibular y el conducto de glándula parótida de ratón adulto se conectaron y la vía secretora salival se conservó, el 30° día después del trasplante del germen de glándula salival regenerativo, el sitio del trasplante y el conducto de glándula parótida se expusieron mediante un método quirúrgico, y se inyectó una solución de azul de Evans por microinyección hacia el germen de glándula salival regenerativo desde el conducto más hacia el lado de la cavidad bucal que en el sitio de trasplante del germen de glándula salival regenerativo.

50

Como resultado, bajo observación con un microscopio estereoscópico, se observó que la solución de azul de Evans inyectada fluía a través del conducto de la glándula parótida hacia el germen de glándula salival regenerativo trasplantado (figura 14). Esto sugiere que la glándula salival regenerativa y el conducto de la glándula parótida se conectaron y se conservó la vía secretora salival.

55

Tras comparar las transiciones en peso y tasa de supervivencia entre un ratón deficiente en glándulas salivales del que se extirparon todas las glándulas salivales y un ratón del que se extirparon todas las glándulas salivales y después se le trasplantó un germen de glándula salival regenerativo con una guía en un el sitio de glándula submandibular (el ratón de trasplante), el ratón deficiente en glándulas salivales continuó perdiendo peso cada día que se realizó un seguimiento después del día de la extirpación de la glándula salival, mientras que el peso del ratón de trasplante se recuperó gradualmente aproximadamente al 3° o 4° día después del trasplante y se recuperó a un peso casi normal en aproximadamente el 6° día (figura 15). Asimismo, la tasa de supervivencia del ratón deficiente en glándulas salivales fue del 20 % o menos a partir del 4° día y más allá después del día de la extirpación de la glándula salival, mientras que la tasa de supervivencia del ratón de trasplante fue aproximadamente del 70 % a partir del 4° día y más allá después del día del trasplante (figura 15).

65

(III. Producción de glándula lagrimal regenerativa)

(1) Producción de germen de glándula lagrimal regenerativo y cultivo de órganos

- 5 Se produjo un germen de glándula lagrimal regenerativo usando el método de germen de órgano para la regeneración de una glándula lagrimal de la siguiente manera.

Se extrajo quirúrgicamente un germen de glándula lagrimal de un feto de ratón C57BL/6 a una edad gestacional de 16,5 a 17,5 días. El germen de glándula lagrimal extraído se hizo reaccionar durante 1,5 minutos a 25 °C en una solución de Dispasa II (Becton Dickinson) con una concentración final de 50 U/ml. Posteriormente, el germen de glándula lagrimal se aisló en un tejido epitelial de glándula lagrimal y un tejido mesenquimatoso de glándula lagrimal usando una aguja de inyección de 25G. Además, el tejido mesenquimatoso se sometió a un tratamiento enzimático de 10 minutos en un baño caliente a 37 °C con una solución de collagenasa que tenía una concentración final de 50 U/ml (Worthington, Lakewood, NJ) y una solución de tripsina (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) que tenía una concentración final del 0,25 % y después hizo pasar a través de un filtro de células de poros de 22 µm para obtener células mesenquimatosas completamente unificadas. El tejido epitelial se sometió a dos tratamientos enzimáticos de 15 minutos en un baño caliente a 37 °C con una solución de collagenasa que tenía una concentración final de 100 U/ml (Worthington, Lakewood, NJ), seguido de un tratamiento enzimático de 5 minutos en un baño caliente a 37 °C con una solución de tripsina (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) que tenía una concentración final del 0,25 % y después se hizo pasar a través de un filtro de células de poros de 22 µm para obtener células epiteliales completamente unificadas.

Usando las células epiteliales y las células mesenquimatosas obtenidas, se produjo un germen de glándula lagrimal regenerativo en un gel de colágeno mediante el método de germen de órgano. Los procedimientos detallados fueron los siguientes. Las células epiteliales unificadas y las células mesenquimatosas unificadas obtenidas como se ha descrito anteriormente se transfirieron individualmente a microtubos de 1,5 ml (Eppendorf) recubiertos con grasa de silicona y después se centrifugaron. El sobrenadante en la solución de cultivo después de la centrifugación se eliminó por completo con puntas GELoader Tip 0,5-20 ml (Eppendorf), y las células epiteliales unificadas y las células mesenquimatosas unificadas se recogieron respectivamente como precipitados. A continuación, se preparó una gota de gel de colágeno dejando gotear 30 µl de Cellmatrix tipo I-A (Nitta Gelatin, Osaka, Japón) en una placa de Petri recubierta con grasa de silicona (Dow Coming Toray). Aproximadamente 0,3 µl de las células mesenquimatosas unificadas preparadas como se ha descrito anteriormente se inyectaron en la gota de gel de colágeno usando una punta de pipeta de 0,1 a 10 ml (Quality Scientific Plastics) para producir un agregado celular. A continuación, se inyectaron aproximadamente 0,2 µl de las células epiteliales unificadas preparadas como se ha descrito anteriormente en la misma gota de gel usando una punta de pipeta de 0,1 a 10 ml (Quality Scientific Plastics) para contactar estrechamente con el agregado de células mesenquimatosas, produciendo de este modo un agregado celular de las células epiteliales y las células mesenquimatosas derivadas del germen de glándula lagrimal (figura 16).

El agregado celular de las células epiteliales derivadas del germen de glándula lagrimal y las células mesenquimatosas derivadas del germen de glándula lagrimal producido en el gel se transfirió junto con el gel de colágeno a un Cell Culture Insert (Becton Dickinson) con un tamaño de poro de 0,4 µm, en el cual se había colocado una placa de 6 pocillos (Becton Dickinson) a la que se le añadió 1 ml de DMEM10, y después se sometió a cultivo de órganos en condiciones de 37 °C, CO₂ al 5 %, y 95 % de humedad para producir un germen de glándula lagrimal regenerativo.

Durante el cultivo de órganos del germen de glándula lagrimal regenerativo, se observó que las células epiteliales comenzaron a invaginarse hacia el lado de las células mesenquimatosas 24 horas después del inicio del cultivo similar al germen de glándula lagrimal extraído del feto (figura 17). A partir de dicho resultado, se demostró que un germen de glándula lagrimal regenerativo puede producirse usando el método de germen de órgano.

(2) Producción de germen de glándula lagrimal regenerativo con guía y trasplante

Un hilo bioabsorbible (Gunze Co.) con una longitud total de 3 mm se insertó desde el lado de las células epiteliales en el germen de glándula lagrimal regenerativo producido mediante el método descrito en (1) anteriormente, mientras se confirmaba con un microscopio estereoscópico, para penetrar verticalmente a través de la superficie de contacto entre la parte de células epiteliales y la parte de células mesenquimatosas sin dañar la estructura del germen de glándula lagrimal regenerativo (particularmente la superficie de contacto entre las células epiteliales y las células mesenquimatosas). Después de la inserción de la guía, el germen de glándula lagrimal regenerativo se sometió al cultivo de órganos durante 2 días.

Después de realizar el cultivo de órganos, se extirpó la parte acinosa de la glándula lagrimal de un ratón adulto para exponer la parte de conducto, y el germen de glándula lagrimal regenerativo se trasplantó al conducto de glándula lagrimal usando el mismo método que en el caso del trasplante de un germen de glándula salival regenerativo.

Como resultado, tras confirmar el germen de glándula lagrimal regenerativo 20 días después del trasplante, se confirmó que se había adherido en el sitio del trasplante y había crecido significativamente (figura 18). Asimismo, se confirmó visualmente que el germen de glándula lagrimal regenerativo estaba conectado al conducto de glándula lagrimal natural.

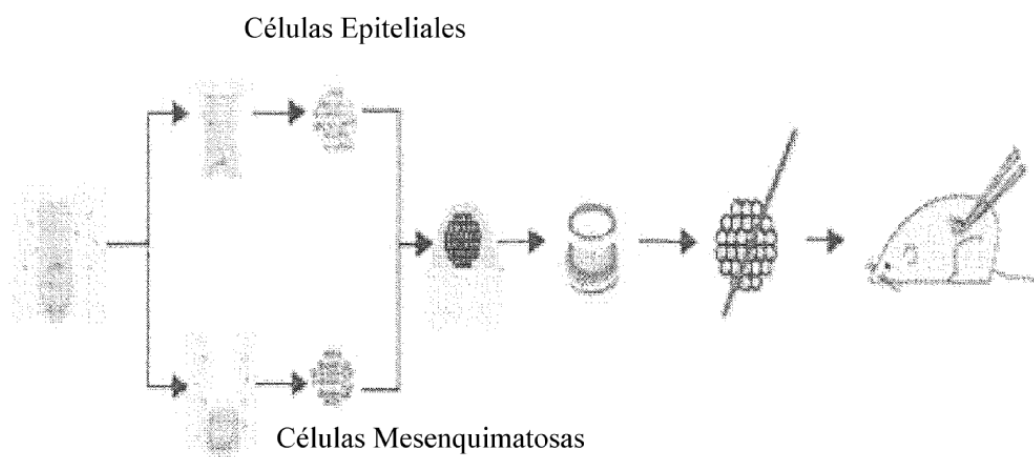
5 Como se explicó en detalle anteriormente, el germen de órgano regenerativo dotado de una guía de acuerdo con la invención de la presente solicitud se conectó de manera fiable a las células epiteliales del lado del receptor y se convirtió en un órgano regenerativo funcional después del trasplante. En particular, en el germen de folículo piloso regenerativo, estaba claro que el crecimiento del pelo desde la superficie del cuerpo se produce con una frecuencia alta. El folículo piloso regenerativo conservó la continuidad a través de la parte de poro con la capa epidérmica receptora a lo largo del ciclo capilar, y se observó un crecimiento repetido del pelo en la misma ubicación. Asimismo, la técnica de trasplante de un germen de folículo piloso regenerativo con una guía fue muy simple y ampliamente aplicable. Asimismo, en un órgano regenerativo que tiene un conducto, la parte derivada de células epiteliales del germen de órgano regenerativo y el conducto del lado del receptor podrían conectarse de manera estable entre sí después del trasplante en el receptor, y estaba claro que la función del órgano podría exhibirse a través del conducto.

10 Al proporcionar los efectos descritos anteriormente, el germen de órgano regenerativo para trasplante producido mediante la presente invención puede proporcionar técnicas médicas novedosas de reemplazo de órganos y regenerativas que pueden aplicarse ampliamente en el campo de la industria médica.

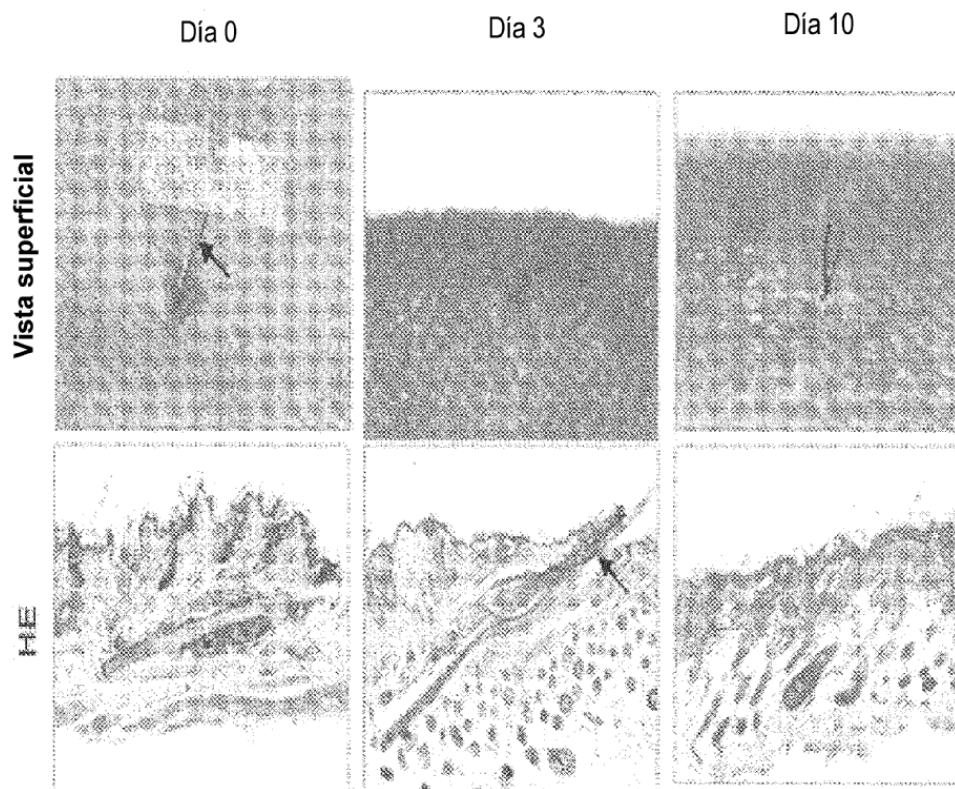
REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un germen de órgano regenerativo dotado de una guía para trasplante, que comprende:
preparar un germen de órgano regenerativo poniendo en contacto estrecho una primera masa celular que consiste
5 sustancialmente en células mesenquimatosas y una segunda masa celular que consiste sustancialmente en células
epiteliales y cultivar estas masas celulares dentro de un soporte; e
insertar la guía en el germen de órgano regenerativo,
en el que la guía es una fibra hecha de un polímero, una fibra metálica, una fibra de carbono, una fibra química y una
fibra animal o vegetal natural, y
10 en el que el germen de órgano regenerativo es un germen de anexo epitelial.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el método comprende además cultivar el germen de órgano
regenerativo durante varios días después de insertar la guía.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que al menos una de las primera y segunda masas celulares
se deriva de un órgano que es la diana de regeneración.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la primera masa celular y la segunda masa celular se
derivan de un órgano que es la diana de regeneración.
20
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el germen de órgano regenerativo
es uno de primordios de órgano seleccionados del grupo que consiste en germen de folículo piloso regenerativo,
germen de glándula sudorípara regenerativo, germen de glándula sebácea regenerativo, germen de glándula salival
regenerativo, germen de glándula mamaria regenerativo, germen de nefrona renal regenerativo, germen de glándula
25 lagrimal regenerativo y germen de glándula endocrina regenerativo.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el germen de órgano regenerativo es un germen de folículo
piloso regenerativo y las células epiteliales son células epiteliales de la región del abultamiento o células epiteliales
basales de la matriz capilar.
30
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que el germen de órgano regenerativo es un germen de
folículo piloso regenerativo y las células mesenquimatosas son células de papila pilosa o células de la vaina de la raíz
dérmica.
- 35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el germen de órgano regenerativo es un germen de glándula
salival regenerativo y las células epiteliales son células epiteliales derivadas de glándula salival y las células
mesenquimatosas son células mesenquimatosas derivadas de glándula salival.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el germen de órgano regenerativo es un germen de glándula
40 lagrimal regenerativo y las células epiteliales son células epiteliales derivadas de glándula lagrimal y las células
mesenquimatosas son células mesenquimatosas derivadas de glándula lagrimal.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la guía es una fibra química.
- 45 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la guía es bioabsorbible.
12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la guía es un hilo de nailon.

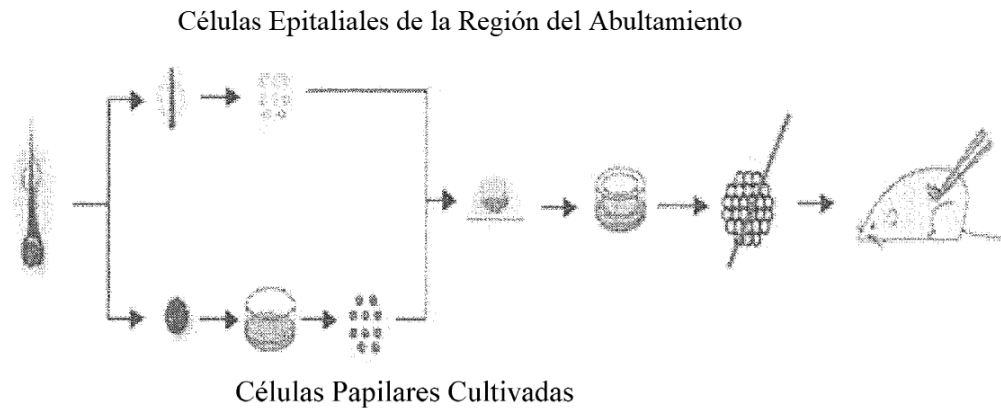
[FIG. 1]



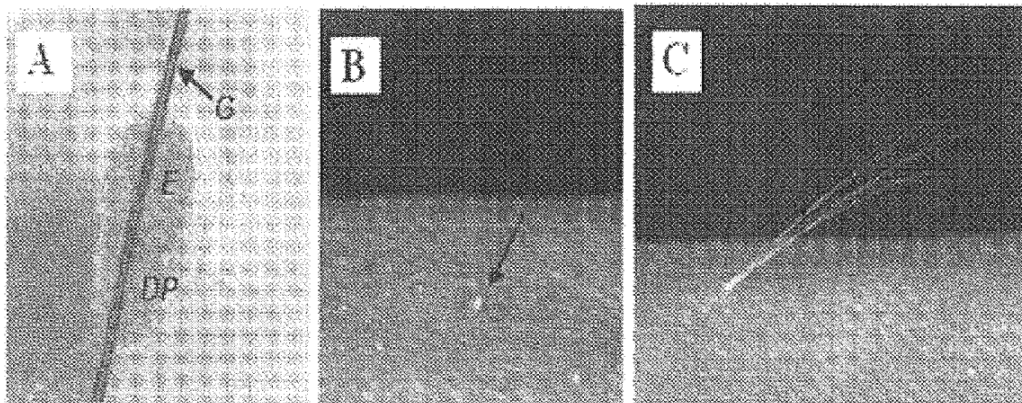
[FIG. 2]



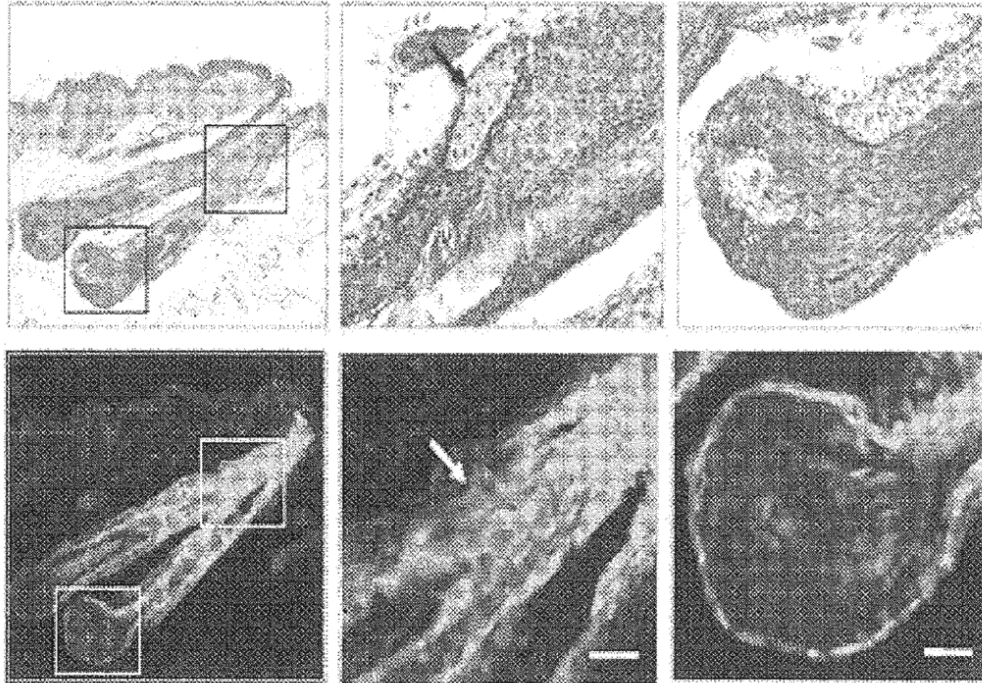
[FIG. 3]



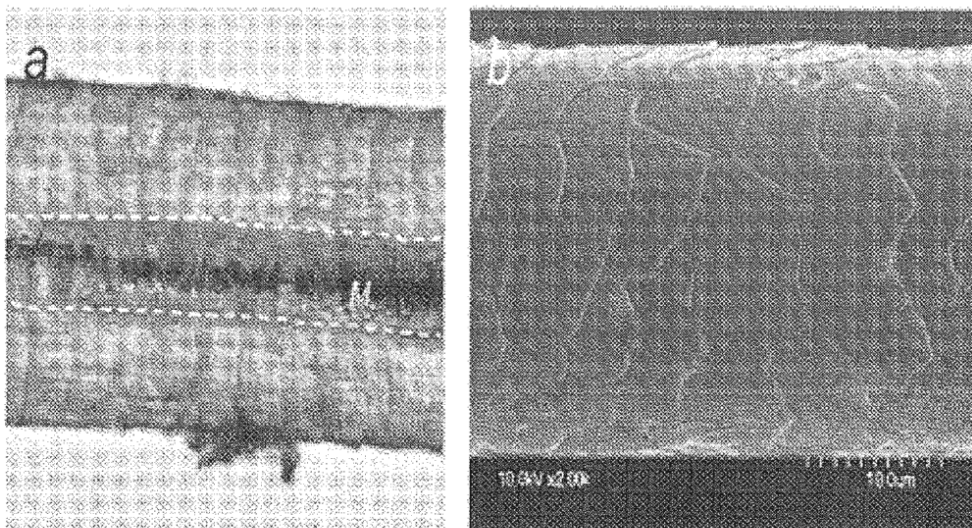
[FIG. 4]



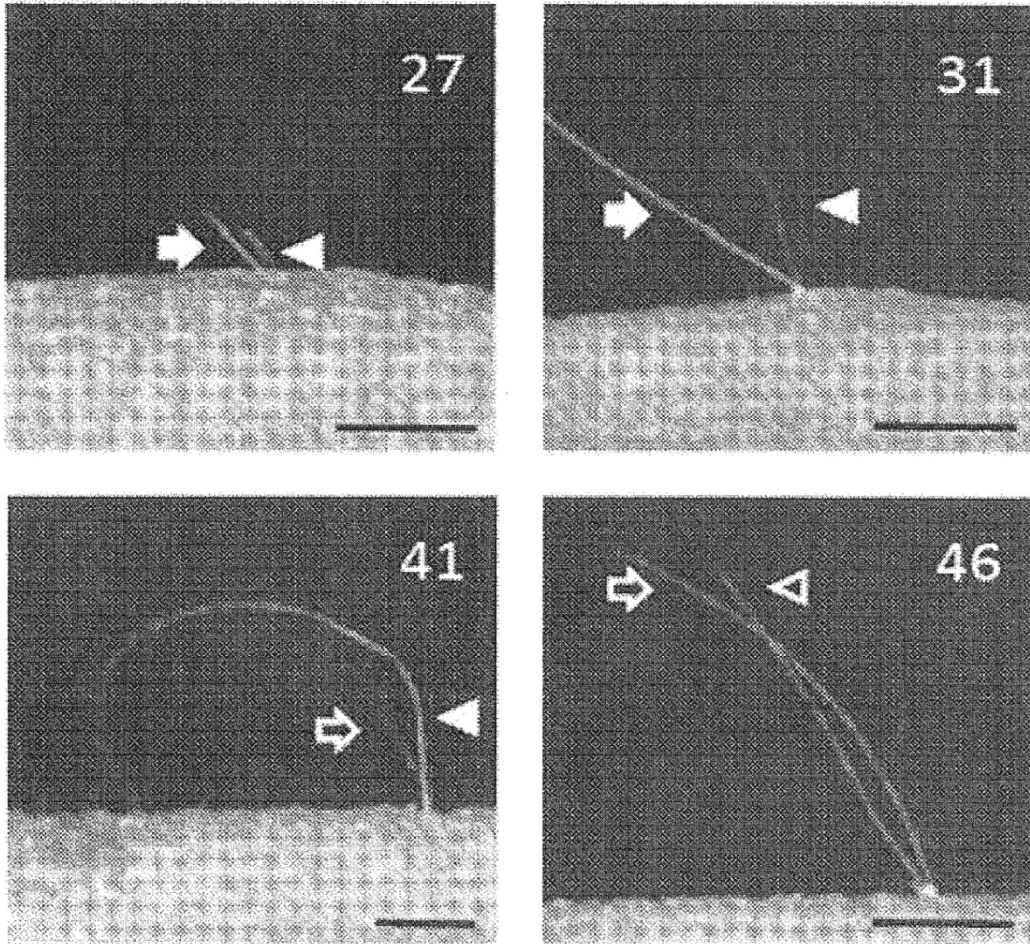
[FIG. 5]



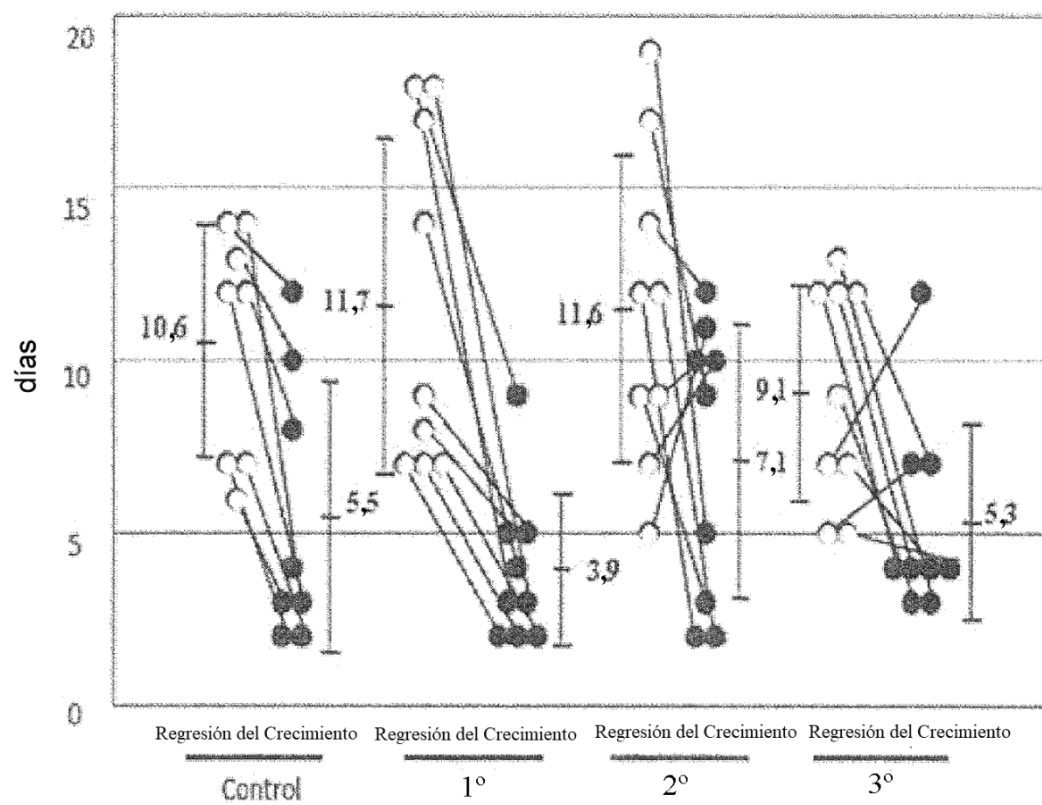
[FIG. 6]



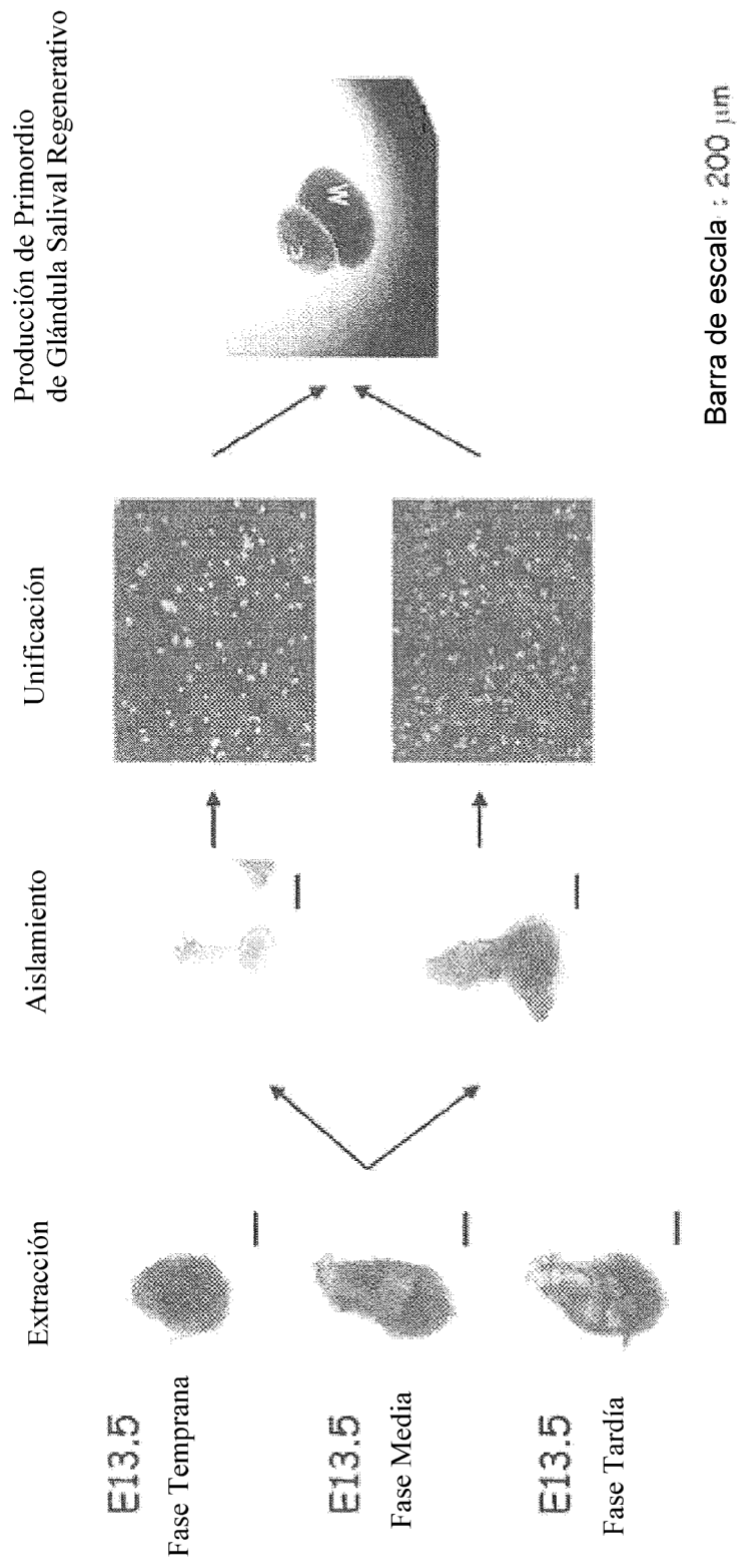
[FIG. 7]



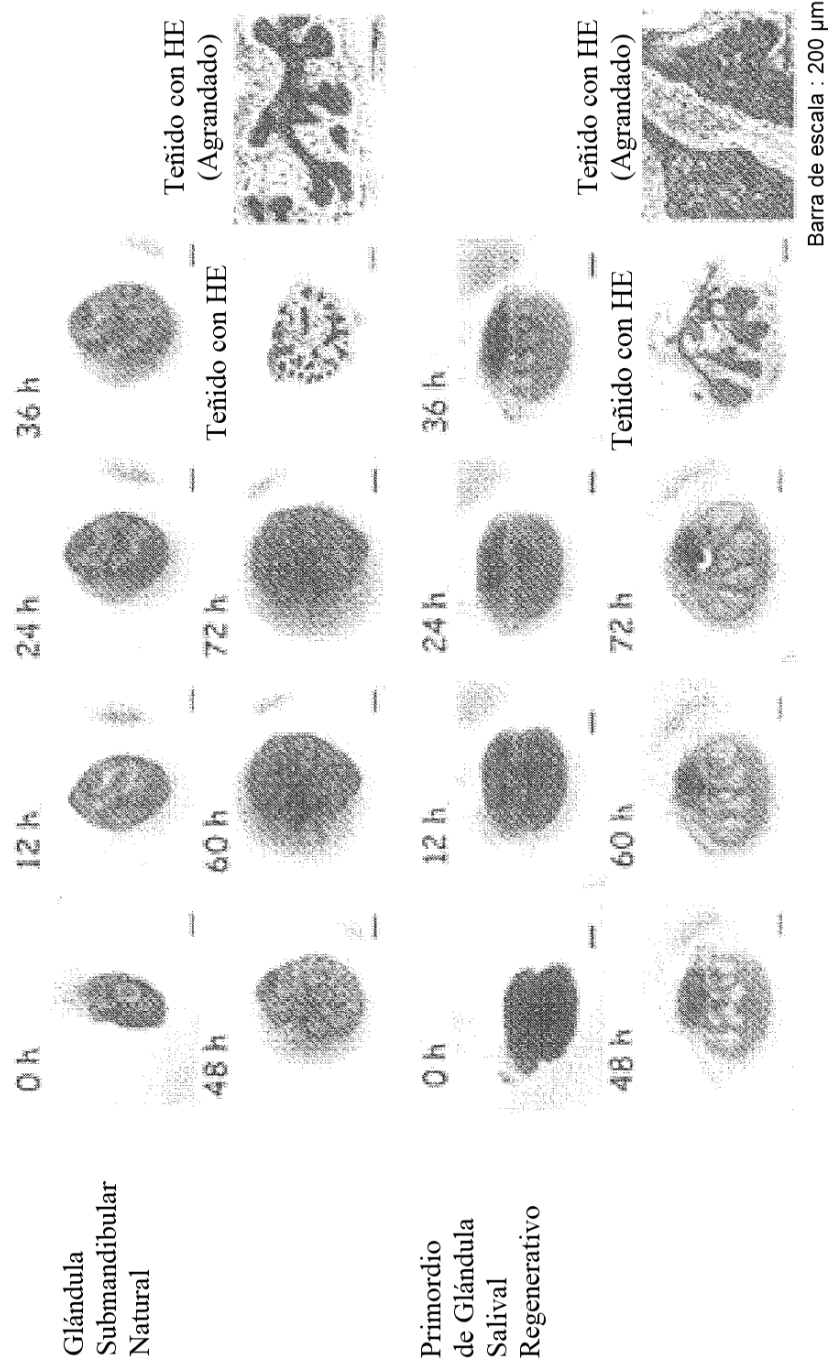
[FIG. 8]



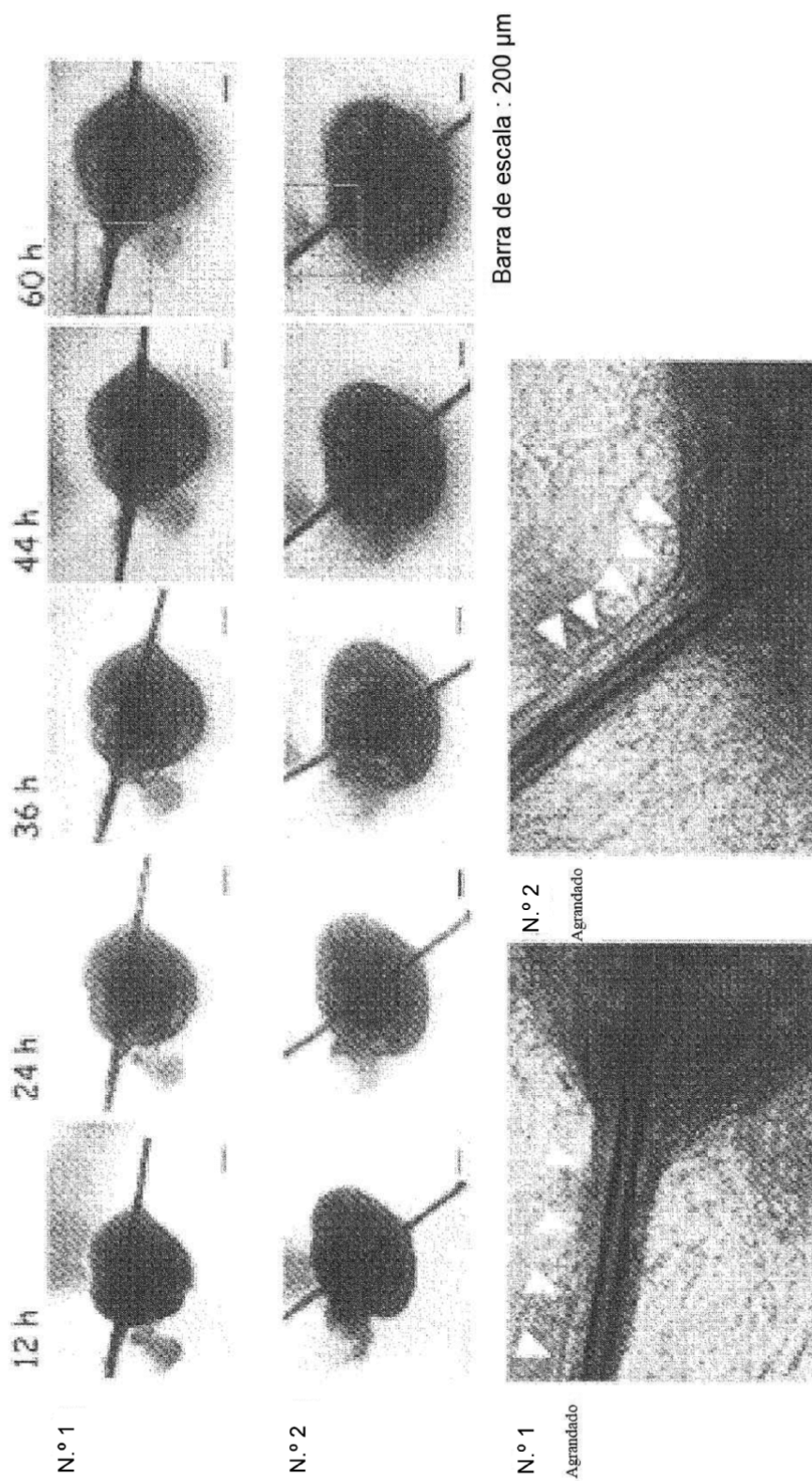
[FIG. 9]



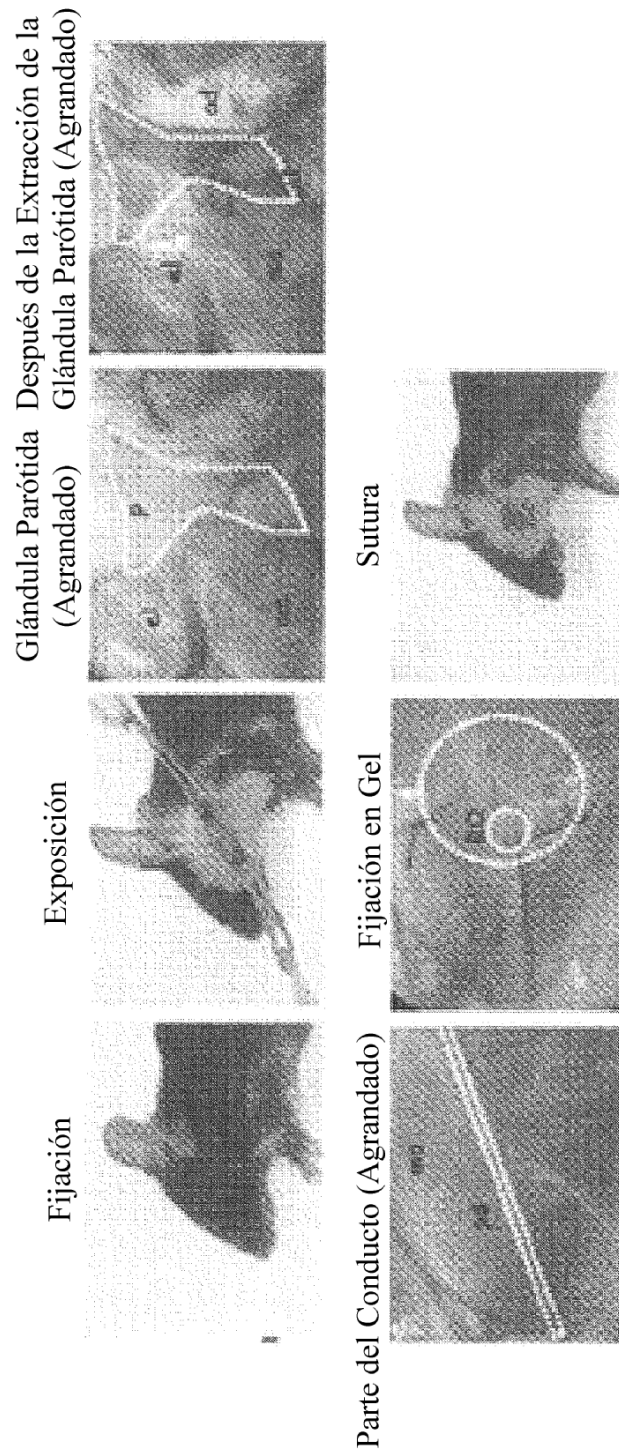
[FIG. 10]



[FIG. 11]

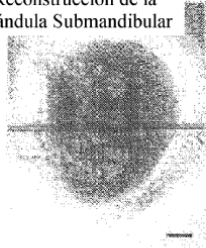


[FIG. 12]

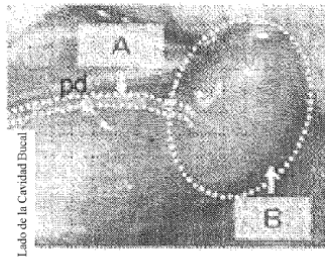


[FIG. 13]

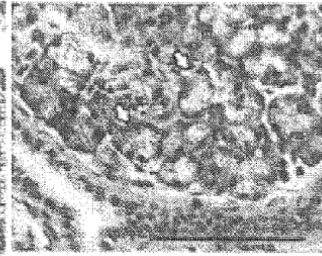
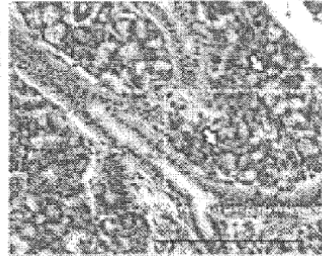
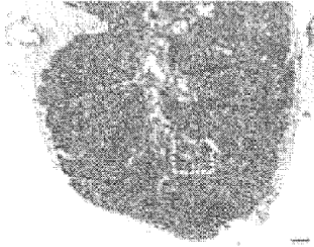
Inmediatamente Antes del Trasplante
Reconstrucción de la
Glándula Submandibular



34 Días Después del Trasplante



Imágenes Teñidas con HE (34 Días Después del Trasplante)



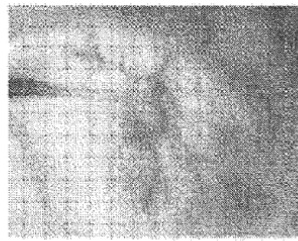
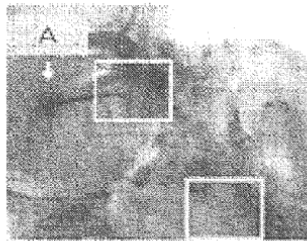
Barra de escala : 200 mm

Barra de escala : 100 mm

[FIG. 14]

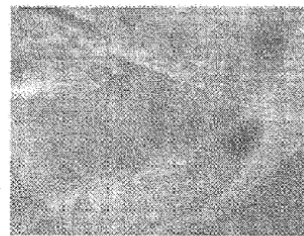
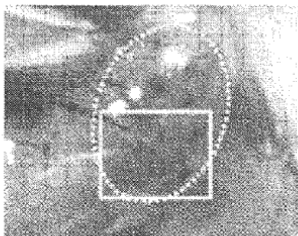
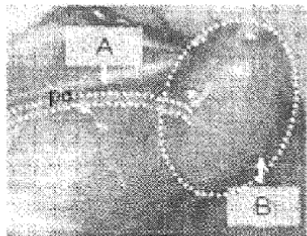
Después de la Inyección de Azul de Evans

Glándula Parótida Natural

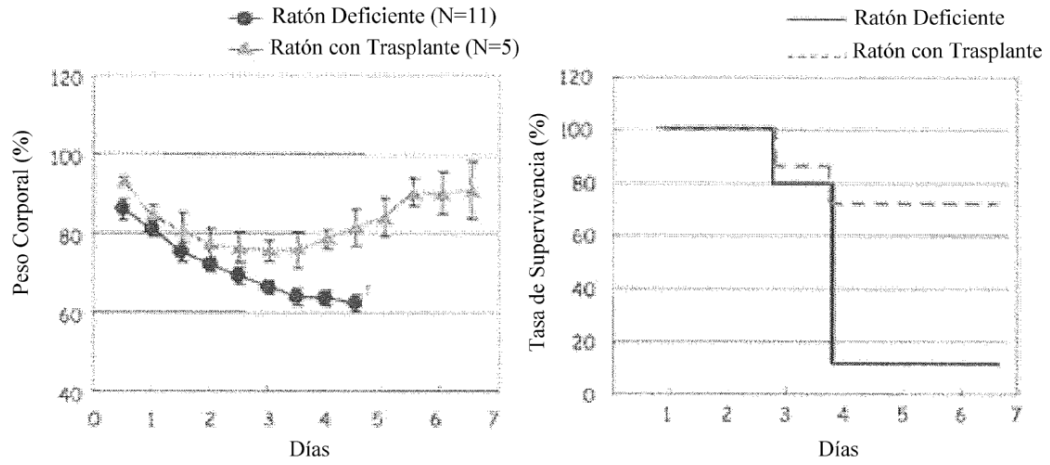


Antes de la Inyección de Azul de Evans Después de la Inyección de Azul de Evans

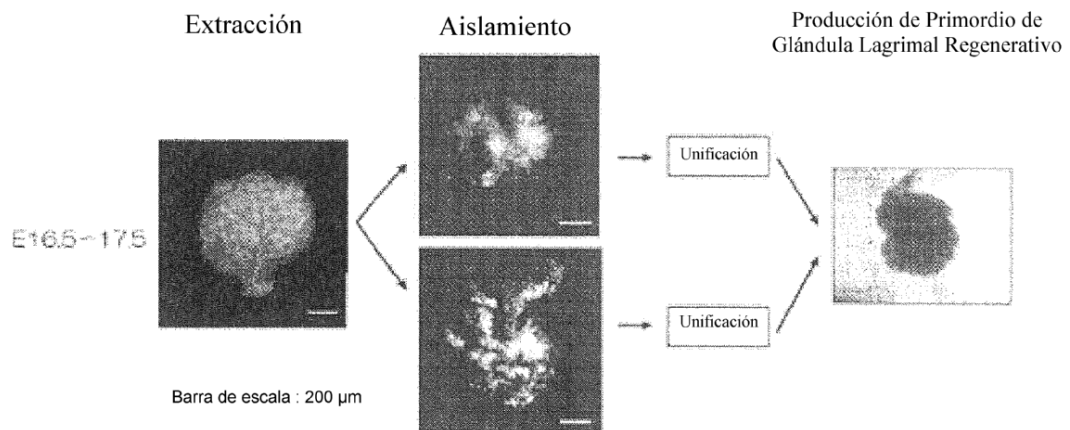
Primordio de Glándula
Salival Regenerativo



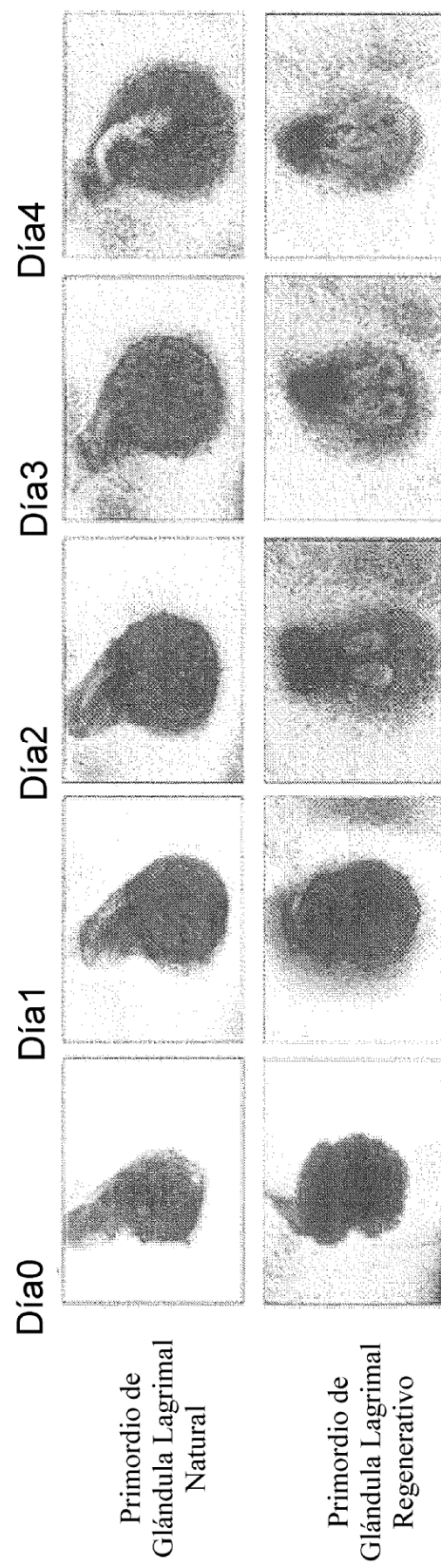
[FIG. 15]



[FIG. 16]

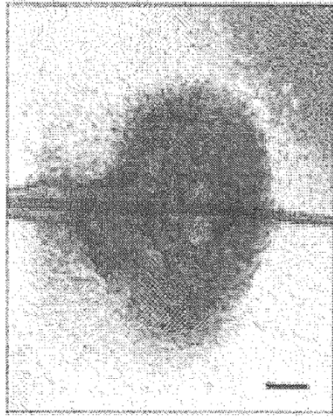


[FIG. 17]



[FIG. 18]

Inmediatamente Antes del Trasplante



20 Días Después del Trasplante

