

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 781 334**

51 Int. Cl.:

A61L 15/40 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.08.2016 PCT/EP2016/069189**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.03.2017 WO17032614**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.08.2016 E 16753883 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3325025**

54 Título: **Composición y productos que comprenden células senescentes para su uso en la regeneración de tejidos**

30 Prioridad:

21.08.2015 EP 15182070

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

01.09.2020

73 Titular/es:

**QRSKIN GMBH (100.0%)
Friedrich-Bergius-Ring 15
97076 Würzburg, DE**

72 Inventor/es:

FUNK, MARTIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 781 334 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición y productos que comprenden células senescentes para su uso en la regeneración de tejidos

5 Campo de la invención

La invención se refiere a células senescentes cultivadas *in vitro*, tales como células epiteliales, queratinocitos y/o fibroblastos, así como a su uso en la fabricación de productos para la regeneración de tejidos, particularmente para el tratamiento de heridas tales como quemaduras o úlceras.

10

Antecedentes de la invención

Los productos biológicamente activos que comprenden células, por ejemplo queratinocitos alogénicos, ya sea solos o en combinación, están bien establecidos en la fabricación de productos para tratar heridas, particularmente quemaduras o úlceras. Mientras que en el pasado, los queratinocitos alogénicos se usaban principalmente para el reemplazo de la piel (véase, por ejemplo, Hansbrough J F, Morgan J L, Greenleaf G E and Bartel R, 1993. *J. Bum Care and Rehab.* 14 (5), 485-494), se descubrió que el éxito del tratamiento no se debe a que los queratinocitos crecen en la herida y "reemplazan" las células. En cambio, los queratinocitos trasplantados solo permanecen en la herida durante un cierto período de tiempo y luego desaparecen o se eliminan, pero estimulan el propio procedimiento de cicatrización del cuerpo mediante la reepitelización debido a una compleja red de factores secretados (véase, por ejemplo, Kawai K, Ikarashi Y, Tomiyama K, Matsumoto Y, Fujiwara M, *Transplantation*, 1993 Aug; 56(2):265-9).

15

20

25

En particular, los productos de queratinocitos conocidos en la técnica se centran principalmente en células en proliferación.

Por ejemplo, el documento US 7247478 B2 se refiere a queratinocitos con un alto potencial de proliferación, así como a productos que comprenden dichos queratinocitos y un portador.

30

Además, el documento US 20070258958 A1 describe cubiertas de heridas interactivas que comprenden queratinocitos que proliferan activamente en una membrana de biopolímero.

El documento US 6126935 A se refiere a pellas obtenidas de queratinocitos que conservan la capacidad de proliferar y su uso en la cicatrización de heridas.

35

Además, el documento WO02078721 A (EP 1450827 B1) describe el uso de composiciones de dos constituyentes para la producción *in situ* de trasplantes celulares que comprenden fibroblastos y queratinocitos cultivados en suspensión.

40

El documento US 6673603 B2 muestra una pasta celular para la regeneración de tejidos, por ejemplo, en el tratamiento de heridas de la piel que contienen una combinación de fibroblastos y queratinocitos que secretan sustancias biológicamente activas, mezcladas con un material de matriz extracelular de manera que la mezcla forma una pasta celular viscosa. Estos pueden volverse mitóticamente inactivados por irradiación o Mitomicina C.

45

Además, el documento US 8323638 B2 describe una preparación celular que consiste en fibroblastos y queratinocitos, que podría aplicarse al lado de la herida en forma de pulverizador o pasta.

Sin embargo, los productos de queratinocitos conocidos en la técnica son ya sea complejos de ganar, engorrosos de aplicar, complejos de almacenar y/o no proporcionan un cóctel óptimo de factores biológicamente activos particularmente apropiados para el tratamiento eficiente de heridas. Por consiguiente, existe una necesidad y, de este modo, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición eficaz para mejorar la regeneración de tejidos, particularmente para mejorar el tratamiento de heridas y afecciones inflamatorias. Adicionalmente, es un objetivo proporcionar un producto biológicamente activo mejorado que sea fácil de manejar en términos de aplicación y/o almacenamiento.

50

55

El documento US2003/165482 A1 describe una preparación celular útil para la regeneración de tejidos, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de heridas de la piel, que contiene uno o más tipos de células que secretan una o más sustancias biológicamente activas, mezcladas o aplicadas a una matriz extracelular o material de matriz. Las células se pueden inactivar mitóticamente, por ejemplo, por mitomicina C, irradiación por rayos X o luz UV, etc. y se puede seleccionar, por ejemplo, de fibroblastos y queratinocitos. La molécula biológicamente activa puede ser FGF, VEGF, IL-6, etc.

60

Estos, así como otros objetos, que serán evidentes a partir de la siguiente descripción de la presente invención, se logran mediante el objeto de las reivindicaciones independientes. Algunas de las realizaciones preferidas de la presente invención están definidas por el tema de las reivindicaciones dependientes

65

Resumen de la invención

La invención se refiere a una composición según la reivindicación 1 que comprende un componente celular, en el que el componente celular incluye un tipo de célula senescente o una combinación de tipos de células senescentes, y en el que la composición es para su uso en la regeneración de tejidos. Realizaciones ventajosas se describen en las reivindicaciones dependientes. Un aspecto adicional de la invención es una composición de factores SASP que comprende al menos IL-8, GRO α , VEGF, endotelina, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, TIMP1, TIMP2 y TGF- β 1, que opcionalmente comprende además factores SASP seleccionados del grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18, MCP1, MCP2, MCP4, MIF, MIP-1a, MIP-3a, HCC-4, Eotaxina-3, TECK, ENA-78, I-309, I-TAC, GRO α , GRO γ , EGF, HGF, FGF, bFGF, KGF, Anfiregulina, Angiogenina, APOJ, CAV1, OSTEO, Epiregulina, Heregulina, SCF, SDF-1 alfa, PIGF, IGFBP-2, -3, -4, -6, -7, GM-CSF, PDGF-BB, TGF- α , TGF- β 2, TGF- β 3, ICAM1, ICAM3, TRAIL-R3, Fas, OPG, SGP130, EGF-R uPAR, sTNFR1, sTNFR3, MMP1, MMP2, MMP3, MMP14, PAI1, PAI2, Park7 DJ-1, uPA/Uroquinasa, SLPI, Sindecano 1, -4, Tenascina C, Colágenos, Fibronectinas, Lamininas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una tabla que muestra los resultados de la expresión y secreción de proteína del factor SASP en queratinocitos de prepucio neonatal epidérmico, cuyas células senescentes se pueden usar en una realización de la presente invención.

La figura 2 muestra una tinción con β -galactosidasa de una capa de células de queratinocitos, que es típica, pero de ejemplo de las células senescentes que se pueden usar en una realización de la presente invención.

La figura 3 muestra una tinción con anti-LAMP-1 de la capa de células de queratinocitos, que es típica, pero de ejemplo de células senescentes que se pueden usar en una realización de la presente invención.

La figura 4 muestra una tinción con anti-fosfo-histona H2A.X de la capa celular de queratinocitos, que es típica, pero de ejemplo de las células senescentes que se pueden usar en una realización de la presente invención.

La figura 5 muestra los resultados de estudios clínicos que usan capas de células de queratinocitos en una realización de la presente invención.

La figura 6 muestra un perfil SASP de queratinocitos primarios humanos (BKB12002) dependiendo del estímulo de crecimiento.

La figura 7 muestra un perfil β -SASP de células en senescencia replicativa de queratinocitos humanos primarios (BKB12002).

La figura 8 muestra un perfil SASP de células senescentes tratadas con t-BHP o etanol.

La figura 9 muestra un perfil SASP de células senescentes tratadas con surfactante.

La figura 10 muestra una tinción con β -galactosidasa de fibroblastos irradiados.

La figura 11 muestra un perfil SASP de células tratadas con Mitomicina C.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describe ahora con más detalle mediante realizaciones y ejemplos preferidos, que sin embargo se presentan solo con fines ilustrativos y no se entenderá que limitan la primicia de la presente invención de ninguna manera.

La presente invención comprende una composición que incluye células senescentes como se definió anteriormente para mejorar la regeneración de tejidos, particularmente para la cicatrización de heridas. De este modo, es particularmente apropiado y útil para el tratamiento de heridas, incluidas cualquier herida aguda y/o crónica, por ejemplo heridas de la piel tales como quemaduras, preferiblemente quemaduras de espesor parcial superficial y profundo y/o quemaduras de segundo grado, o trastornos de cicatrización de heridas crónicas seleccionados del grupo que consiste en úlceras, particularmente isquémicas, arteriales, venosas, neurotróficas, vasculitis, hipertensiva y pioderma gangrenosa, úlceras por decúbito o úlceras por presión, síndrome del pie diabético o en el que la herida es una lesión por abrasión, trauma, radioterapia o cualquier tipo de piel perdida o afecciones inflamatorias de la piel y el tejido subcutáneo como la dermatosis eritematoscamosa, dermatitis atópica y afecciones relacionadas, dermatitis por contacto y otros eccemas, dermatitis debida a sustancias tomadas internamente, dermatosis ampollasas, afecciones eritematosas, psoriasis y trastornos similares, liquen, prurito y afecciones relacionadas, y otras enfermedades de la piel y el tejido subcutáneo como el queratosis actínica, alopecia y acné.

La "senescencia (celular)" es un mecanismo que ocurre *in vivo* e *in vitro* bloqueando la célula en una detención del ciclo celular, y en este contexto convencional se sabía que inhibía la transformación maligna y contribuía al envejecimiento. Se informa que una amplia gama de diferentes factores de estrés desencadena la senescencia celular (Ben-Porath I, Weinberg RA, J.Clin.Investig. 2004; 113:8-13; Ben-Porath I, Weinberg RA, Int. J. Biochem. Cell Biol. 2005; 37:961-76). Estos incluyen disfunción telomérica por división celular repetida (senescencia replicativa), estrés oxidativo, deterioro mitocondrial, daño grave o irreparable del ADN y distribución de cromatina (estrés genotóxico) y la expresión de ciertos oncogenes (Schmitt CA. Nat. Rev. Cancer. 2003;3:286-95; Martin GM, Cell. 2005;120:523-32; Balaban RS, Nemoto S, Finkel T, Cell. 2005;120:483-95). Además de su papel bien establecido como un potente mecanismo supresor de tumores y un contribuyente al envejecimiento, hay evidencia de que las células senescentes desarrollan actividades secretoras alteradas, promoviendo de este modo la tumorigénesis ((Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez P, Campisi J; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001;98:12072-77; Coppé JP, Boisen M, Sun CH, Wong BJ, Kang MK, et al, Mol. Cancer Res. 2008;6:1085-98). Por ejemplo, Coppé y colegas describieron que los fibroblastos que tienen un fenotipo secretor asociado a la senescencia convierten de este modo a los fibroblastos senescentes en células proinflamatorias que tienen la capacidad de promover la progresión tumoral (Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. Annu Rev Pathol. 2010;5:99-118). Recientemente, ha surgido un cuarto papel de senescencia, cuando Krizhanovsky et al. descubrieron que la hiperproliferación inducida por daño tisular de las células estrelladas hepáticas (HSC) induce la senescencia celular que conduce a una reducción en la secreción de proteínas de la matriz extracelular (ECM) y una secreción mejorada de proteínas degradantes de la ECM, lo que limita la fibrosis en el daño tisular dentro del hígado (Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW (2008), Cell 134(4):657-667; 54. Sagiv A, Biran A, Yon M, Simon J, Lowe SW, Krizhanovsky V, (2013) Oncogene 32(15):1971-1977). Preferiblemente, la "senescencia" no se reducirá simplemente a la detención del ciclo celular. Más bien, la senescencia puede ser causada por la estimulación del crecimiento, cuando se detiene el ciclo celular (Blagosklonny MV, March 2012, AGING Vol 4, No 3, pp 159-165; AGING, February 2011, Vol 3, No 2, pp 94-101). De este modo, como otro sello distintivo, las células senescentes pueden perder el potencial de reanudar la proliferación.

Sin embargo, una célula senescente es una célula potencialmente persistente que es metabólicamente activa y ha sufrido grandes cambios en el patrón de expresión y secreción de proteínas, desarrollando de este modo finalmente su SASP individual que se asemeja a un tipo de huella digital (Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. Annu Rev Pathol. 2010;5:99-118). Este hecho puede explicar las cuatro funciones obviamente opuestas de las células senescentes mencionadas anteriormente, destacando la importancia del contexto celular, esto es, el tipo de célula y el estímulo inductor de la senescencia (Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. Annu Rev Pathol. 2010;5:99-118; Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, et al. PLoS Biol. 2008;6:2853-68). El SASP (fenotipo secretor asociado a la senescencia), también denominado secretoma de mensajes de senescencia que se asemeja a otro sello distintivo de la senescencia, puede incluir la expresión/secreción de los siguientes factores biológicamente activos (Pawlikowski JS, Adams PD and Nelson DM, September 15, 2013 J Cell Sci 126, 4061-4067):

- i. Interleucinas, tales como IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-13, IL-15;
- ii. Quimiocinas, tales como IL-8, MCP2, MCP4, GRO α , GRO β , GRO γ ;
- iii. Factores de crecimiento, tales como EGF, HGF, VEGF;
- iv. Receptores y ligandos, tales como ICAM1, ICAM3, TRAIL-R3, Fas, uPAR, sTNFR1, sTNFR1III;
- v. Proteasas y reguladores, tales como MMP1, MMP3, MMP10, MMP12, TIMP1, TIMP2, PAI1, PAI2,
- vi. Moléculas insolubles extracelulares, tales como colágenos, fibronectinas, lamininas.

Además de la detención del ciclo celular mencionada anteriormente y el SASP específico, se puede caracterizar una célula senescente por los siguientes sellos distintivos (Pawlikowski JS, Adams PD and Nelson DM, September 15, 2013 J Cell Sci 126, 4061-4067):

- a. Morfología aplanada y ampliada
- b. expresión de p16^{INK4a}
- c. actividad lisosómica elevada (b-galactosidasa asociada a la senescencia; SA b-gal)
- d. Respuesta al daño del ADN
- e. remodelación de cromatina
- f. autofagia

Sorprendentemente y distinto de investigaciones anteriores de productos relacionados, el presente inventor descubrió que las células particularmente senescentes muestran un SASP complejo que proporciona un cóctel de factores biológicamente activos que es específicamente efectivo para estimular la propia reepitelización del cuerpo. La correlación entre el efecto terapéutico pretendido y el estado celular asociado de senescencia se ha demostrado experimentalmente, como se describe en los ejemplos y como se ilustra en los dibujos. De este modo, el concepto inventivo general es hacer un uso beneficioso de la senescencia en la terapia de heridas e inflamación. Por el contrario, los productos biológicamente activos conocidos en la técnica como se mencionó anteriormente se centran principalmente en células caracterizadas por una alta tasa de proliferación, suprimiendo de este modo las rutas de senescencia.

Las "células senescentes", como se entiende en la presente invención, son células caracterizadas por la detención del ciclo celular, caracterizadas además por lo general por un SASP que comprende uno o más de los siguientes factores: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18, MCP1, MCP2, MCP4, MIF, MIP-1a, MIP-3a, HCC-4, Eotaxina-3, TECK, ENA-78, I-309, I-TAC, GRO α , GRO β , GRO γ , VEGF, EGF, HGF, FGF, bFGF, KGF, Anfiregulina, Epiregulina, Heregulina, SCF, SDF-1 alfa, PIGF, IGFBP-2, -3, -4, -6, -7, GM-CSF, PDGF-BB, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, ICAM1, ICAM3, TRAIL-R3, Fas, OPG, SGP130, EGF-R uPAR, sTNFRI, sTNFRIII, MMP1, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, MMP14, TIMP1, TIMP2, PAI1, PAI2, SLPI, Endotelina, Colágenos, Fibronectinas, Lamininas, preferiblemente uno o más de los siguientes: IL-8, GRO α , VEGF, Endotelina, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, TIMP1, TIMP2, TGF- β 1, incluso más preferiblemente comprende al menos IL-8, GRO α , VEGF, Endotelina, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, TIMP1, TIMP2 y TGF- β 1.

Adicionalmente, las "células senescentes", como se entiende en la presente invención, son células caracterizadas por la detención del ciclo celular, caracterizadas por lo general adicionalmente por un SASP que comprende uno o más de los siguientes factores: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18, MCP1, MCP2, MCP4, MIF, MIP-1a, MIP-3a, HCC-4, Eotaxina-3, TECK, ENA-78, I-309, I-TAC, GRO α , GRO β , GRO γ , VEGF, EGF, HGF, FGF, tal como FGF ácido, bFGF, KGF, Anfiregulina, Angiogenina, APOJ, CAV1, OSTEO, Epiregulina, Heregulina, SCF, SDF-1 alfa, PIGF, IGFBP-2, -3, -4, -6, -7, GM-CSF, PDGF-BB, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, ICAM1, ICAM3, TRAIL-R3, Fas, OPG, SGP130, EGF-R uPAR, sTNFRI, sTNFRIII, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, MMP14, TIMP1, TIMP2, PAI1, PAI2, Park7 DJ-1, uPA/Uroquinasa, SLPI, Sindecano 1, -4, Tenascina C, Endotelina, Colágenos, Fibronectinas, Lamininas, preferiblemente uno o más de los siguientes: IL-8, GRO α , VEGF, Endotelina, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, TIMP1, TIMP2, TGF- β 1, incluso más preferiblemente comprende al menos IL-8, GRO α , VEGF, Endotelina, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, TIMP1, TIMP2 y TGF- β 1.

La expresión y/o secreción de dichos factores SASP se puede incrementar en células inducidas por senescencia en comparación con las células de control correspondientes, esto es, células no senescentes. Preferiblemente, la expresión y/o secreción de dichos factores SASP aumenta significativamente. La importancia se puede calcular mediante cualquier método matemático conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la prueba t de Student. Como se quiere decir en este documento, la expresión y/o secreción de los factores SASP mencionados anteriormente aumenta, si es al menos 1.5 veces mayor en comparación con las células de control correspondientes. Preferiblemente, la expresión es al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, aún más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 10 veces, incluso más preferiblemente al menos 20 veces, en particular al menos 50 veces más en comparación con las células de control

Además, las células senescentes de la presente invención pueden mostrar particularmente actividad de SA β -gal, detención de la proliferación, expresión de p16^{INK4a}, señalización de daño en el ADN, disfunción de los telómeros y/o pérdida de lamina B1, al menos detención de la proliferación y/o actividad de SA β -gal. Adicionalmente, pueden mostrar un aumento de la expresión de LAMP 1 o fosfohistona H2A.X.

Adicionalmente, las células senescentes de la presente invención pueden mostrar las siguientes características morfológicas: morfología aplanada, agrandada, hipertrofia, núcleos agrandados, remodelación de cromatina, reorganización de la cromatina mediante la formación de focos heterocromáticos asociados a la senescencia (SAHF), aparato de Golgi prominente y citoplasma vacuolado. Además, la senescencia según la invención puede ser replicativa, esto es, depende del acortamiento de los telómeros o de la senescencia prematura, esto es, en ausencia de cualquier pérdida o disfunción detectable de los telómeros.

En particular, se ha encontrado que la composición según la invención es particularmente eficaz cuando comprende más del 30% de células senescentes cultivadas *in vitro* en el componente celular, preferiblemente más del 50% de células senescentes cultivadas *in vitro*, más preferiblemente más del 70% de células senescentes cultivadas *in vitro*, e incluso más preferiblemente más del 90% de células senescentes cultivadas *in vitro*. Alternativamente, más del 10% de células senescentes cultivadas *in vitro* en el componente celular, preferiblemente más del 30% de células senescentes cultivadas *in vitro*, más preferiblemente más del 50% de células senescentes cultivadas *in vitro*, incluso más preferiblemente más del 70% en las células senescentes cultivadas *in vitro* y, en particular, más del 90% de células senescentes cultivadas *in vitro*, son particularmente eficaces.

Las células según la invención incluyen ya sea un tipo de célula senescente o una combinación de tipos de células senescentes. Por ejemplo, las células de las que derivan las células senescentes usadas según la invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en células epiteliales, células epiteliales corneales, queratinocitos, fibroblastos, melanocitos, células endoteliales, pericitos, monocitos, linfocitos, trombocitos, mastocitos, adipocitos, células musculares, neuronas, osteocitos, osteoblastos, condrocitos, células madre mesenquimales y/o células madre adultas o embrionarias. Preferiblemente, las células de las que derivan las células senescentes usadas según la invención, se pueden seleccionar del grupo que consiste en células epiteliales, células epiteliales corneales, queratinocitos, fibroblastos, melanocitos, células endoteliales, pericitos, monocitos, linfocitos, trombocitos, mastocitos, adipocitos, células madre mesenquimales y/o células madre adultas o embrionarias. Adicionalmente, las células según la invención se pueden modificar genéticamente para secretar factores SASP como se definió anteriormente. Esta secreción puede ser constitutiva o se puede controlar mediante el cambio de genes. Adicionalmente, las células según la invención pueden incluir células no senescentes.

Todas las células según la invención pueden ser autólogas, alogénicas o xenogénicas, preferiblemente alogénicas. Preferiblemente, las células según la invención son humanas. Adicionalmente, las células pueden ser transgénicas.

En particular, las células según la invención incluyen queratinocitos, más particularmente queratinocitos epidérmicos primarios, por ejemplo queratinocitos aislados de un donante. Estos queratinocitos se pueden aislar de una piel humana adulta o neonatal, preferiblemente de un prepucio neonatal humano. El aislamiento y el cultivo inicial de los queratinocitos se pueden realizar por cualquier experto en el arte, por ejemplo, según el procedimiento descrito por Rheinwald and Green in 1975 (Cell, Volume 6, Issue 3, November 1975, Pages 331-343). Sin embargo, estos queratinocitos también pueden incluir líneas celulares de queratinocitos.

En una realización preferida, los queratinocitos se parecen al tipo de célula principal de la composición de la presente invención, esto es, al menos el 50% de todas las células en la composición son queratinocitos, preferiblemente al menos el 75-85% de todas las células en la composición son queratinocitos, más preferiblemente al menos 85 - 95% de todas las células en la composición son queratinocitos. Pueden ser senescentes y/o no senescentes. De estos, preferiblemente más del 10% son senescentes, más preferiblemente más del 30%, incluso más preferiblemente más del 50%, aún más preferiblemente más del 70%, en particular más del 90%.

En una realización preferida de la presente invención, las células se cultivan *in vitro*. Luego, la senescencia según la invención es inducida por condiciones de crecimiento inapropiadas que conducen al estrés del cultivo celular, por ejemplo sobrecrecimiento de las células, alta densidad celular, inhibición del contacto celular, presencia de H₂O₂, presencia de ROS, administración de mitomicina C o cualquier otro inhibidor mitótico de base química, irradiación con rayos γ , irradiación con rayos X o irradiación con luz UV, particularmente UVB como, por ejemplo, se describe por Lewis et al. (Mol Biol Cell. 2008 Apr; 19(4): 1346-1353), y tratamiento con plasma frío (Volotskova et al, Sci Rep. 2012;2:636, doi: 10.1038/srep00636).

En otra realización de la presente invención, la senescencia según la invención es inducida por estrés oxidativo/especies reactivas de oxígeno, radiación o tratamiento con haz de electrones.

Adicionalmente, la senescencia según la invención es inducida por dosis subletales de surfactantes, por ejemplo NP-40, preferiblemente en una concentración de 1-10 μ M, Triton X-100, preferiblemente en una concentración de 2-20 μ M, SDS, Tween 20, Tween 80, preferiblemente en una concentración de 5-20 μ M, cardiolipina y jabón. Para inducir la senescencia, las células se cultivan con surfactantes en concentraciones subletales, por ejemplo, de una a seis semanas.

Alternativamente, la senescencia puede ser inducida por bajas dosis de radiación ionizante como se describe por ejemplo por Tsai K.C. et al. (Cancer Res 2005; 65(15): 6734-44), Papadopoulou A. and Kletsas D. (INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 39: 989-999, 2011, DOI: 10.3892/ijo.2011.1132), y Alessio N. et al. (Oncotarget, Vol. 6, No. 10, 2015, pp. 8155-8166).

Como alternativa, se ha encontrado que niveles relativamente bajos de Mitomicina C son inductores de senescencia, por ejemplo en una concentración de 0.02 - 1 μ M. Preferiblemente, el medio de cultivo celular que incluye Mitomicina C en las concentraciones mencionadas anteriormente se cambia varias veces, por ejemplo de 2 a 7 veces, por ejemplo todos los días a cada tercer día. Entonces, también dosis ligeramente más bajas de Mitomicina C pueden inducir senescencia.

Alternativamente, t-BHP o etanol e inductores de senescencia de moléculas pequeñas en concentraciones adecuadas, como por ejemplo se describe en otra parte (Dierick, J. F. et al. (2002), FEBS Lett 531(3): 499-504; Pascal, T. et al (2005), FEBS Lett 579(17): 3651-3659; Ewald, J. A. et al. (2009), J Biomol Screen 14(7): 853-858 se pueden usar para inducir la senescencia.

El método usado respectivamente se controla, por ejemplo, usando la concentración y la duración del tratamiento apropiadas del agente respectivo o la intensidad y duración apropiadas del tratamiento físico respectivo, en la

medida en que se logre la detención del ciclo celular senescente, lo que puede verificarse por una cualquiera de las características de senescencia o SASP descritas anteriormente.

5 En una realización preferida, se puede inducir la senescencia según la invención, por ejemplo, por uno cualquiera de los métodos o tratamientos anteriores en presencia de un estímulo de crecimiento sostenido, esto es, el estímulo de crecimiento se aplica simultáneamente a la detención del ciclo celular. En otras palabras: la senescencia según esta invención se puede inducir mediante el acoplamiento de la detención del ciclo celular, preferiblemente mediante inhibición de contacto con un estímulo de crecimiento. Tal estímulo de crecimiento según la invención, se puede seleccionar de los medios que consisten en: componentes de medios como suero o componentes de suero en particular de fuente xenogénica o humana, plaquetas, lisados de plaquetas o componentes de la última, así como factores de crecimiento únicos o combinados como por ejemplo EGF, KGF, FGF, insulina, hidrocortisona o apotransferrina en concentraciones conocidas por un experto en el arte. Otro estímulo de crecimiento puede ser TGF-β.

15 Además, la detención/proliferación del ciclo celular se puede analizar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, manchas de ADN que implican 3H-timidina o BrdU o tinción con reguladores del ciclo celular.

20 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un producto para su uso como se menciona anteriormente que comprende las células senescentes, preferiblemente células epiteliales senescentes, queratinocitos y/o fibroblastos y particularmente queratinocitos senescentes como se mencionó anteriormente, y un portador o material portador apropiado. Un portador o material portador apropiado según la presente invención puede ser cualquier matriz o membrana biocompatible, por ejemplo, en forma de un apósito o gasa para heridas que incluye, por ejemplo, películas, tales como películas de poliuretano, hidrocarburos, tales como vaselina, hidrocoloides, hidrogeles, espumas hidrófilas o hidrófobas, y alginatos de calcio, y cualquier solvente, medio de dispersión, recubrimientos, soluciones isotónicas y similares, respectivamente compatibles con la administración de productos biológicos, por ejemplo agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%, liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos conocidos en la técnica, así como aditivos tales como agentes retardadores de absorción. El portador o material portador puede estar parcial o totalmente colonizado con las células mencionadas anteriormente. En una realización preferida de la presente invención, el portador es un apósito para heridas, preferiblemente una gasa de vaselina, más preferiblemente una gasa de vaselina.

35 Dependiendo del portador o material portador mencionado anteriormente, la composición de la presente invención está en forma de un apósito (para heridas), una pasta, un pulverizador o un ungüento. Además, un producto según la invención se administra o aplica por vía tópica, subcutánea o por inhalación.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un producto que comprende lisados de células senescentes que incluyen lisados o lisados de células enteras de un compartimento celular particular, o comprende sobrenadantes de células senescentes, obtenidos respectivamente de las células mencionadas anterior y opcionalmente un portador como se definió anteriormente. El lisado o sobrenadante puede o no contener material celular, sin importar si aún es viable o no. Además, un producto para su uso según la invención puede comprender un cóctel de factores biológicamente activos, incluidos los factores en su forma aislada, característicos para el SASP de células senescentes como se describe en otra parte en este documento, y opcionalmente un portador como se describe anteriormente. En esta realización, el "componente de células senescentes" según la presente invención significa lisado celular o sobrenadante de células senescentes, o aislado de factor SASP obtenido respectivamente de las células senescentes descritas en este documento, opcionalmente en combinación con un portador apropiado, respectivamente.

50 El aislado de lisado, sobrenadante o SASP mencionado anteriormente se puede combinar respectivamente con una sustancia terapéutica adicional (componente adicional) como se describe más adelante.

La lista preferida de factores SASP presentes en la composición usada según la presente invención, así como sus concentraciones útiles para la terapia especificada se enumeran en la Tabla 1 a continuación:

55

	Tabla 1:					
	Secretado (pg/ml)			Intracelular (pg/mg extracto de proteína)		
	Al menos	Límite superior apropiado y opcional	preferido	Al menos	Límite superior apropiado y opcional	preferido
IL8	50	5000	200 - 3000	5	500	20 - 100
GRO alfa	100	5000	250 - 5000	5	500	20 - 100
VEGF	500	20000	2000 - 12000	5	500	20 - 100
Endotelina	10	1000	20 - 300	5	500	20 - 100

	(continuación)				Intracelular (pg/mg extracto de proteína)	
	Al menos	Límite superior apropiado y opcional	preferido	Al menos	Límite superior apropiado y opcional	preferido
MMP7	1000	150000	8000 – 80000	100	10000	1000 - 10000
MMP9	500	20000	2400 -10000	100	10000	1000 - 10000
MMP10	10000	82000	30000 – 82000	1000	20000	5000 - 20000
MMP12	50	50000	400 – 36000	5	100	20 - 100
MMP13	10	10000	90 - 7500	50	1000	200 - 1000
TIMP1	20000	400000	55000 – 350000	100	10000	1000 - 10000
TIMP2	1000	100000	5000 – 60000	100	10000	1000 - 10000
TGf beta 1	500	15000	1000 – 7000	5	1000	20 – 1000

Adicionalmente, los productos especificados anteriormente pueden incluir adicionalmente células viables y/o muertas.

5 Dependiendo de la naturaleza de la herida o afección inflamatoria, la invención se refiere además a una combinación farmacéutica que comprende un producto según la invención junto con un agente antimicrobiano, por ejemplo un antibiótico o un agente antifúngico que incluye antibióticos de la clase de cefalosporinas, por ejemplo Cefazolina, Cefoxitina, Cefofetan; macrólidos, por ejemplo eritromicina; sulfonamidas, por ejemplo, Mafenida; penicilinas, clorhexidina, sulfadiazina de plata, nitrato de plata y formulaciones derivadas de plata o - en el contexto de una herida diabética - en combinación con un fármaco antidiabético, por ejemplo un inhibidor de DDP-4, tal como Linagliptina, Sitagliptina, Vildagliptina o Saxagliptina. Además, la combinación farmacéutica puede incluir adicionalmente o en lugar de los antagonistas de los agentes mencionados anteriormente contra ARNm o miARN sobreexpresados en heridas crónicas no curativas; factores de crecimiento como por ejemplo PDGF, FGF-2, VEGF-A,-B, -C,-D, GM-CSF, SDF-1alfa, IL1-beta o péptidos derivados de estos factores de crecimiento; inhibidores de enzimas que participan en la síntesis de cortisol, particularmente CYP11B1 sobreexpresado en heridas crónicas, así como de Prolil-4- hidroxilasa, elastasa, fosforilación de GSK3β y Cx43.

20 El componente adicional (por ejemplo, agente antimicrobiano, fármaco antidiabético u otro agente como se menciona anteriormente) se puede administrar o aplicar antes, concurrente o consecutivamente, preferiblemente concurrentemente con el producto mencionado anteriormente. Por consiguiente, una realización preferida se refiere a un kit que comprende un producto como se definió anteriormente y cualquier agente como se menciona anteriormente, preferiblemente un agente antimicrobiano y/o un agente antidiabético, preferiblemente un inhibidor de DDP-4.

25 Además, la composición como se menciona anteriormente se puede usar en combinación con terapia de compresión o presión negativa.

30 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de células senescentes o un producto o combinación como se mencionó anteriormente para preparar un medicamento para tratar heridas y/o afecciones inflamatorias.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de crioconservación de células senescentes o un producto como se mencionó anteriormente por congelación, secado o liofilización.

35 Las composiciones mencionadas anteriormente se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración. El régimen de dosificación se selecciona de un médico o veterinario normalmente capacitado según una variedad de factores que incluyen especies, edad, peso, sexo y condición médica del paciente, el tipo y la gravedad de la herida, la forma de administración y el tipo de célula particular.

40 Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones preferidas de la presente invención. El montaje del apósito para heridas y la crioconservación se pueden llevar a cabo como se describe en el documento WO96/14738A (EP0790767B), en particular como se describe en el Ejemplo 1 del mismo.

45 Ejemplo 1:

Preparación y cultivo de queratinocitos alogénicos humanos, inducción de senescencia:

50 Los queratinocitos según la invención se aíslan según el procedimiento descrito por Rheinwald and Green in 1975 (Cell, Volume 6, Issue 3, November 1975, Pages 331-343) de biopsias de piel del prepucio u otros sitios, preferiblemente de prepucio neonatal humano. En la producción final de la capa de células queratinocitos de la capa

celular, las células se sembraron a una densidad de 5000 células/cm² y se cultivaron durante 14 días sin dividir las células y aplicar 4 cambios de medios. El medio se complementó con una combinación de factores de crecimiento que incluyen FCS (4%), EGF (10 ng/μl), insulina (0.12 U/μl), hidrocortisona (0.8 μg/μl) o apotransferrina (5 mg/μl) para mantener un estímulo constante de alto crecimiento. Después de 6-9 días, las células se ralentizaron o detuvieron la proliferación y finalmente al final del cultivo mostraron un fenotipo de senescencia como también se muestra en la figura 2.

Determinación de la senescencia analizando el SASP

Para determinar el tipo y la cantidad de factores SASP secretados por los queratinocitos inducidos por la senescencia, se recogieron los sobrenadantes de los matraces de cultivo celular después de la etapa de cultivo final antes de la crioconservación de las células y se midieron las concentraciones de proteínas de los factores SASP como se muestra en la Figura 1. Las concentraciones de proteínas se cuantificaron usando los inmunoensayos multiplex Bio-Plex® o los kits ELISA de BIO-RAD. La Figura 1 (secretada) muestra las concentraciones de factores secretados como valores medios y las desviaciones estándar correspondientes de los sobrenadantes de tres matraces de cultivo celular.

Los niveles intracelulares de factores SASP de láminas epidérmicas crioconservadas se cuantificaron en extractos de proteínas obtenidos por lisis de una capa celular usando el kit de lisis celular Bio-Plex™ de BIO-RAD. En la Figura 1 (intracelular) se representan las concentraciones de los factores de SAP determinados como se describió anteriormente en factor pg/μg del extracto de proteína.

La senescencia según la invención se puede analizar adicional o alternativamente mediante tinción con SA β-Gal o mediante tinción inmune usando anticuerpos anti-LAMP 1 y/o H2A.X como se ilustra en el Ejemplo 2 a continuación.

Ejemplo 2

2.1 Determinación de la senescencia por tinción con SA β-Gal

La preparación y cultivo de queratinocitos alogénicos humanos y la inducción de senescencia se llevan a cabo como se describe anteriormente.

Como marcador para la senescencia celular, la tinción con β-Gal a partir de láminas epidérmicas crioconservadas se realizó usando el kit de tinción con β-galactosidasa de senescencia de Cell Signaling. Se incubó 1 cm² de la lámina epidérmica en 2 ml de solución de tinción con β-galactosidasa a 37 °C, durante la noche, se enjuagó 5 veces con 2 ml de PBS y se analizó por microscopía óptica como se muestra en la Figura 2.

2.2 Determinación de la senescencia por tinción inmune contra LAMP 1 y H2A.X

La preparación y cultivo de queratinocitos alogénicos humanos y la inducción de senescencia se llevaron a cabo como se describió anteriormente. Como marcador de senescencia celular, la tinción inmune de láminas epidérmicas criopreservadas se realizó usando anti-fosfo-histona H2A.X de conejo o anti-LAMP 1 de conejo de Cell Signaling. El ensayo se realizó según el protocolo proporcionado por el proveedor. Para potenciar o permitir la inmunoreacción entre el anticuerpo y el antígeno, se realizó una hidrólisis inducida por calor (microondas) como recuperación de antígeno. La inmunoreacción se detectó mediante un anticuerpo secundario anticonejo o antiratón conjugado con un polímero de peroxidasa. La 3,3'-diaminobencidina (DAB) se usó como cromógeno. Para un análisis más diferenciado de las secciones procesadas, los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina, lo que genera un contraste apropiado al oscurecer la señal DAB y proporcionar una tinción de azul a violeta a los núcleos celulares y una tinción de azul claro a los componentes y fibras somáticas. Para detectar las uniones inespecíficas del anticuerpo secundario, el anticuerpo primario se omitió y se reemplazó por una solución de preincubación (que contiene solo PBS y BSA).

Como se muestra en la Figura 3 (A y B), las secciones teñidas frente a LAMP 1 muestran una fuerte tinción ubicua punteada que es por lo general para células senescentes pero no una tinción inespecífica para el anticuerpo secundario. Las secciones teñidas frente al marcador de senescencia H2A.X muestran una tinción nuclear más fuerte pero no una tinción inespecífica para el anticuerpo secundario Figura 4 (A-C).

Ejemplo 3

Efecto terapéutico de los queratinocitos senescentes.

El apósito para heridas obtenido mediante un método según el Ejemplo 1 y/o 2 mejora la cicatrización de heridas como se analizó en un estudio clínico con pacientes que sufren quemaduras de grado 2 y los datos se resumen en la Fig. 3 a continuación. En resumen, se incluyeron 297 pacientes con una edad entre 2 meses y 16 años en el estudio, que estaba bien equilibrado por género (45% mujeres/55% hombres). La causa principal de las quemaduras

fueron escaldaduras y la mediana del área de superficie quemada total de los pacientes fue de alrededor del 12%. El tratamiento resultó en una epitelización de las heridas en 6 días (mediana). El 52% de los pacientes mostraron una curación después de 6 días, el 78% o el 95% de los pacientes mostraron una curación después de 9 o 14 días (Figura 5).

5

Ejemplo 4

Perfil SASP dependiendo del estímulo de crecimiento

10 Los queratinocitos primarios humanos (BKB12002) derivados del prepucio neonatal (De Corte, Verween et al. 2012) se cultivaron en placas de 6 pocillos recubiertos con colágeno I usando medio EpiLife + suplemento S7 de Gibco™. Los componentes que proporcionan un estímulo de crecimiento en el suplemento S7 son, por ejemplo, EGF, TGF-β e insulina. Las células se cultivaron hasta 80% de confluencia, el medio se eliminó y las células se cultivaron adicionalmente durante 7 días usando medio EpiLife sin; con 0.5x o con 1.0x suplemento S7 que proporciona el estímulo de crecimiento. Se recogieron los sobrenadantes de los pocillos de cultivo celular al final del cultivo y se midieron las concentraciones de proteína de los factores SASP como se muestra en la Figura II. Las concentraciones de proteínas se cuantificaron usando los inmunoensayos multiplex Bio-Plex® o los kits ELISA de BIO-RAD. La Figura 6 muestra el cambio relativo de las concentraciones de factores secretados en comparación con el valor sin S7 basado en los valores medios de los sobrenadantes de dos pocillos de cultivo celular.

15

20

Ejemplo 5:

Perfil SASP de células en senescencia replicativa

25 Para determinar los cambios en el perfil de los factores SASP en las células BKB12002 humanas primarias que experimentan senescencia replicativa, las células se cultivaron hasta el pasaje 13, en los pasajes 7 y 13, se recogieron los sobrenadantes de los matraces de cultivo celular y se determinaron las concentraciones de proteínas de los factores SASP. Las concentraciones de proteínas se cuantificaron usando los inmunoensayos multiplex Bio-Plex® o los kits ELISA de BIO-RAD. La Figura 7 muestra el cambio relativo de las concentraciones de factores secretados en los sobrenadantes del pasaje 13 en comparación con los valores en el pasaje 7 según los valores medios de los sobrenadantes de dos pocillos de cultivo celular.

30

Ejemplo 6

35 Perfil SASP de células tratadas con t-BHP o etanol

Para determinar los cambios en el perfil de los factores SASP en células de una línea celular de fibroblastos humanos (SCRC1041) que sufren estrés induce senescencia, las células se trataron con etanol o t-BHP como se describe. Las células se cultivaron hasta un 80% de confluencia, el medio se eliminó y las células se cultivaron adicionalmente durante tres días con el mismo medio realizando un tratamiento diario con etanol al 5% durante 2 horas o 30 μM de t-BHP, durante 1 hora. La Figura 8 resume los cambios en los niveles de factores SASP secretados que se determinaron como se describió anteriormente.

40

Ejemplo 7

45

Perfil SASP de células tratadas con surfactante

Las células BKB10002 de queratinocitos primarios humanos se trataron con el surfactante NP40 para inducir la senescencia. Las células se cultivaron en medio EpiLife + suplemento S7 sin (control) o con NP40 2 μM, durante 14 días con un cambio de medio cada dos días. En el día 14 de cultivo, el 11% de las células mostraron una tinción positiva de β-Gal usando el kit de tinción con Cell Signaling y el protocolo del fabricante (no mostrado). Las concentraciones de proteínas en los sobrenadantes de los cultivos celulares se cuantificaron usando los inmunoensayos multiplex Bio-Plex® o los kits ELISA de BIO-RAD. La Figura 9 muestra el cambio relativo de las concentraciones de factores secretados en comparación con el valor de control.

50

55

Ejemplo 8

Pruebas de senescencia con células irradiadas.

60 Para determinar si los fibroblastos humanos (SCRC1041) tratados con diferentes dosis de radiación gamma muestran un fenotipo senescente, las células se trataron con diferentes dosis como se muestra en la figura 10. El porcentaje de células positivas para β-Gal se determinó como se describe en el ejemplo 7.

Ejemplo 9

65 Perfil SASP de células tratadas con mitomicina

Se incubaron queratinocitos BKB12002 o fibroblastos SCRC1041 una vez o repetidas veces con diferentes dosis de mitomicina y se determinó el porcentaje de células positivas para β -galactosidasa y la concentración de factores secretados seleccionados.

- 5 Para el tratamiento único con células de mitomicina se hicieron crecer al 80%. Las células se hicieron crecer al 80% de confluencia usando medio EpiLife + suplemento S7 de Gibco™ y se incubaron durante 5 horas con el mismo medio que incluye las diferentes concentraciones de mitomicina. El medio se retiró, las células se lavaron una vez con PBS y luego las células se cultivaron adicionalmente durante 7 días en medio sin mitomicina.
- 10 Para el tratamiento repetido, las células BKB12002 se cultivaron durante 2 días usando medio EpiLife + suplemento S7 de Gibco™ y luego durante otros 12 días con el mismo medio que contenía las diferentes cantidades de mitomicina y un cambio de medio cada dos días. El porcentaje de células senescentes positivas para la tinción con β -Gal se determinó usando el kit de tinción Cell Signaling y el protocolo del fabricante. Las concentraciones de proteínas en los sobrenadantes de los cultivos celulares se cuantificaron usando los inmunoensayos multiplex Bio-Plex® o los kits ELISA de BIO-RAD. La Figura 11 muestra el cambio de pliegue relativo de las concentraciones de factores secretados en comparación con el valor de control.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un componente celular, en la que el componente celular incluye un tipo de célula senescente o una combinación de tipos de células senescentes, y en la que la composición es para su uso en la regeneración de tejidos.
2. La composición para su uso según la reivindicación 1, en la que el tipo de célula senescente se deriva de células seleccionadas del grupo que consiste en células epiteliales, células epiteliales corneales, queratinocitos, fibroblastos, melanocitos, células endoteliales, pericitos, monocitos, linfocitos, trombocitos, mastocitos, adipocitos, células musculares, neuronas, osteocitos, osteoblastos, condrocitos, células madre mesenquimales y/o células madre adultas o embrionarias, preferiblemente en la que el tipo de célula senescente se deriva de células seleccionadas del grupo que consiste en células epiteliales, células epiteliales corneales, queratinocitos, fibroblastos, melanocitos, células endoteliales, pericitos, monocitos, linfocitos, trombocitos, mastocitos, adipocitos, células madre mesenquimales y/o células madre adultas o embrionarias.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que el componente celular incluye más del 10% de células senescentes, preferiblemente más del 30% de células senescentes, más preferiblemente más del 50% de células senescentes, aún más preferiblemente más del 70% de células senescentes, y particularmente más del 90% de células senescentes, ya sea seleccionadas de un tipo de célula senescente o una combinación de tipos de células senescentes como se definió anteriormente.
4. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células son alogénicas, autogénicas o xenogénicas, preferiblemente alogénicas.
5. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el componente celular incluye principalmente un tipo celular, siendo el tipo celular queratinocitos.
6. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el componente celular incluye queratinocitos senescentes, preferiblemente más del 10% de queratinocitos senescentes, más preferiblemente más del 30% de queratinocitos senescentes, más preferiblemente más del 50% de queratinocitos senescentes, incluso más preferiblemente más del 70% de queratinocitos senescentes, particularmente más del 90% de queratinocitos senescentes.
7. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la senescencia es inducida por el estrés del cultivo celular seleccionado del grupo que consiste en: sobrecrecimiento celular, inhibición del contacto celular, alta densidad celular, estrés oxidativo, presencia de especies reactivas de oxígeno; administración de surfactantes u otros inductores de senescencia de moléculas pequeñas; administración inductora de senescencia de mitomicina C o cualquier otro inhibidor mitótico de base química; o por irradiación con rayos γ , irradiación con rayos X o irradiación con luz UV incluyendo UVB; o por tratamiento con plasma frío, radiación o tratamiento con haz de electrones, en la que la senescencia se induce preferiblemente por estrés del cultivo celular, más preferiblemente por inhibición por contacto celular o administración de surfactantes.
8. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la senescencia se caracteriza por la detención del ciclo celular en presencia de estimulación del crecimiento y/o en la que la senescencia es inducida por la detención del ciclo celular en presencia de la estimulación sostenida del crecimiento.
9. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células senescentes expresan y/o secretan una o más moléculas biológicamente activas seleccionadas del grupo que consiste en: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18, MCP1, MCP2, MCP4, MIF, MIP-1a, MIP-3a, HCC-4, Eotaxina-3, TECK, ENA-78, I-309, I-TAC, GRO α , GRO β , GRO γ , VEGF, EGF, HGF, FGF, bFGF, KGF, Angiregulina, Angiogenina, APOJ, CAV1, OSTEOPONIN, Epiregulina, Heregulina, SCF, SDF-1 alfa, PIGF, IGFBP-2, -3, -4, -6, -7, GM-CSF, PDGF-BB, TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, ICAM1, ICAM3, TRAIL-R3, Fas, OPG, SGP130, EGF-R uPAR, sTNFR1, sTNFR3, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, MMP14, TIMP1, TIMP2, PAI1, PAI2, Park7 DJ-1, uPA/Uroquinasa, SLPI, Sindecano 1, -4, Tenascina C, Endotelina, Colágenos, Fibronectinas, Lamininas, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en: IL-8, GRO α , VEGF, endotelina, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, TIMP1, TIMP2, TGF- β 1, incluso más preferiblemente expresar y/o secretar al menos uno o más, preferiblemente todos IL-8, GRO α , VEGF, Endotelina, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, TIMP1, TIMP2 y TGF- β 1; y/o en el que las células senescentes se caracterizan por una o más, preferiblemente todas las características seleccionadas del grupo que consiste en: actividad SA β -gal, detención de la proliferación, expresión de p16^{INK4a}, señalización de daño en el ADN, disfunción de los telómeros, pérdida de lamina B1, preferiblemente mostrar al menos actividad SA β -gal y/o detención de la proliferación.
10. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de una herida aguda o crónica y/o una afección inflamatoria.

- 5 11. La composición para su uso según la reivindicación 10, en la que la herida es una quemadura, particularmente una quemadura seleccionada del grupo que consiste en: quemadura de espesor parcial superficial y/o profundo, quemadura de segundo o tercer grado, quemadura solar, y/o en la que la herida es un trastorno crónico de cicatrización de heridas seleccionado del grupo que consiste en úlceras, úlceras por presión, síndrome del pie diabético.
- 10 12. La composición para su uso según la reivindicación 10, en la que la afección inflamatoria es una inflamación de la piel y el tejido subcutáneo, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en: dermatosis eritematoscamosa, dermatitis atópica, dermatitis, eccema, dermatosis ampollasas, enfermedades eritematosas, psoriasis y trastornos similares, liquen, prurito, queratosis actínica, alopecia y acné.
- 15 13. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un portador, en el que el portador se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: apósito para heridas, pasta, pulverizador, ungüento, más preferiblemente en el que el portador es un apósito para heridas.
- 20 14. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una sustancia seleccionada del grupo que consiste en:
- un agente antimicrobiano;
- un agente antidiabético;
- antagonistas de ARNm o miARN contra ARNm o miARN sobreexpresados en heridas crónicas no curativas;
- 25 factores de crecimiento, preferiblemente PDGF, FGF-2, VEGF-A, -B, -C, -D, GM-CSF, SDF-1 alfa, IL1-beta o péptidos derivados de estos factores de crecimiento; e
- 30 inhibidores de enzimas que participan en la síntesis de cortisol, particularmente CYP11B1 sobreexpresada en heridas crónicas, así como de Prolil-4-hidroxilasa, elastasa, fosforilación de GSK3 β y Cx43.
- 35 15. Una composición para su uso en una condición o tratamiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo la composición un lisado celular, un sobrenadante celular o un aislado de factor SASP obtenido respectivamente de las células senescentes como se define, caracteriza y/o trata en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, opcionalmente en combinación con un portador como se define en la reivindicación 13 y/o con una sustancia como se define en la reivindicación 14.
- 40 16. Una composición de factores SASP que comprende al menos IL-8, GRO α , VEGF, endotelina, MMP7, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, TIMP1, TIMP2 y TGF- β 1, que opcionalmente comprende además factores SASP seleccionados del grupo que consiste en IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-10, IL-13, IL-15, IL-18, MCP1, MCP2, MCP4, MIF, MIP-1a, MIP-3a, HCC-4, Eotaxina- 3, TECK, ENA-78, I-309, I-TAC, GRO β , GRO γ , EGF, HGF, FGF, bFGF, KGF, Anfiregulina, Angiogenina, APOJ, CAV1, OSTEO, Epiregulina, Heregulina, SCF, SDF-1 alfa, PIGF, IGFBP-2, -3, -4, -6, -7, GM-CSF, PDGF-BB, TGF- α , TGF- β 2, TGF- β 3, ICAM1, ICAM3, TRAIL-R3, Fas, OPG, SGP130, EGF-R uPAR, sTNFR1, sTNFR3, MMP1, MMP2, MMP3, MMP14, PAI1, PAI2, Park7 DJ-1, uPA/Uroquinasa, SLPI, Sindecano 1, -4, Tenascina C, Colágenos, Fibronectinas, Lamininas.
- 45

Figura 1

Factores SASP			
		secretados*	intracelular*
Quimiocinas			
	<i>IL8</i>	2105 +/- 488	29
	<i>GRO alfa</i>	3977 +/- 705	57
Factores de crecimiento			
	<i>VEGF</i>	8543 +/-684	48
	<i>endotelina</i>	192 +/- 5	26
Proteasas y reguladores			
	<i>MMP 7</i>	48677 +/- 26915	1809
	<i>MMP 9</i>	6383 +/- 2900	3507
	<i>MMP 10</i>	75850 +/- 35553	14637
	<i>MMP 12</i>	22713 +/- 5210	52
	<i>MMP 13</i>	4554 +/- 1291	426
	<i>TIMP 1</i>	140960 +/- 79799	1036
	<i>TIMP 2</i>	25362 +/- 15086	2521
TGF beta 1		5532 +/- 543	n.d.

*sobrenadante pg/ml

+extracto de proteína pg/mg

FIG. 2

Tinción con β -galactosidasa de la capa celular de queratinocitos



20 μ m

FIG. 3

Tinción con anti LAMP-1 de la capa celular de queratinocitos

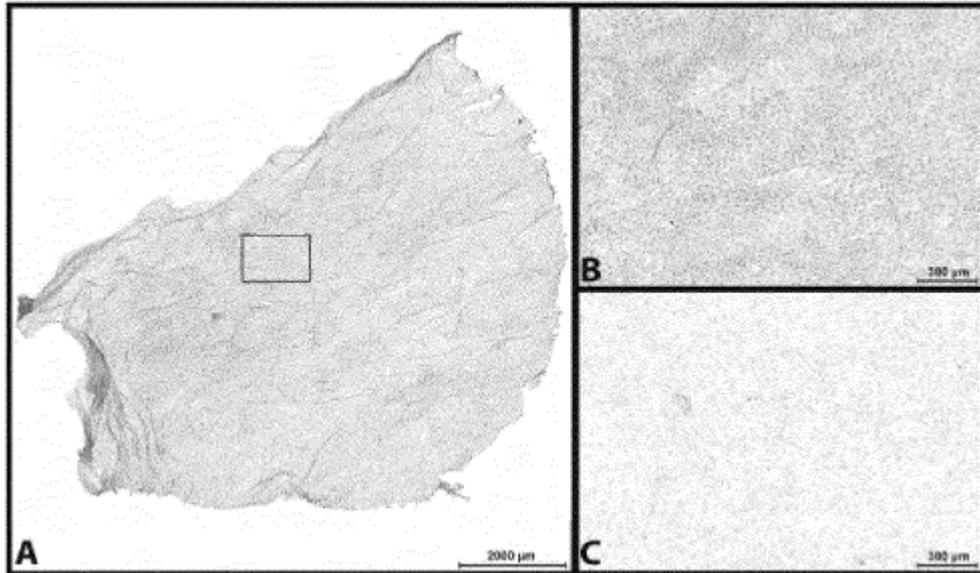


FIG. 4

Tinción con anti-fosfo-histona H2A.X de la capa celular de queratinocitos

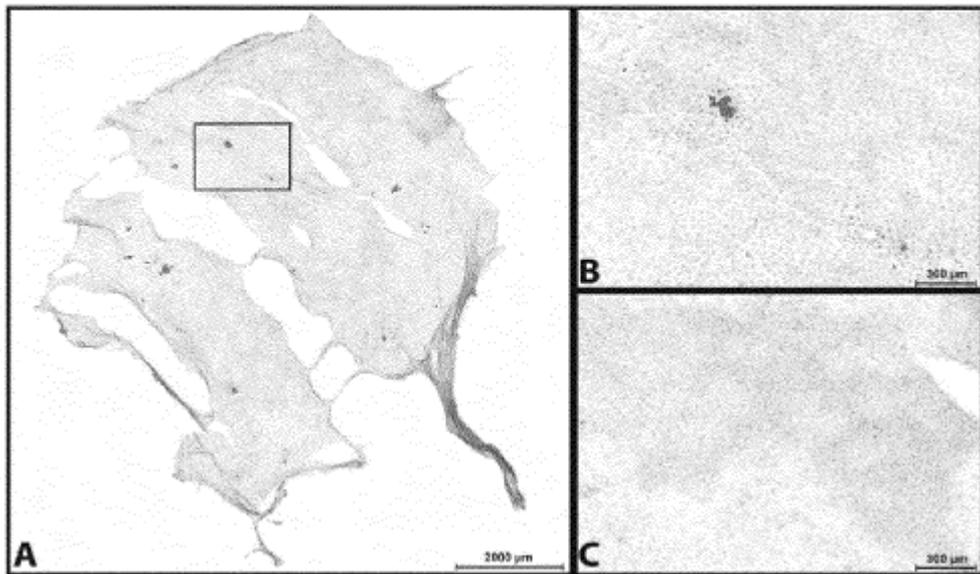


FIG. 5

Tiempo de curación de las heridas por quemaduras

Edad (años)	1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	21	26	35	36
No. Pacientes	1	9	32	73	38	38	24	18	17	13	7	3	8	5	2	3	1	2	1	1	1
% del total	0,3%	3,0%	10,8%	24,6%	12,8%	12,8%	8,1%	6,1%	5,7%	4,4%	2,4%	1,0%	2,7%	1,7%	0,7%	1,0%	0,3%	0,7%	0,3%	0,3%	0,3%
% acumulado		3%	14%	39%	52%	64%	72%	78%	84%	89%	91%	92%	95%	96%	97%	98%	98%	99%	99%	99%	100%

Fig. 6

Perfil SASP dependiendo del estímulo de crecimiento

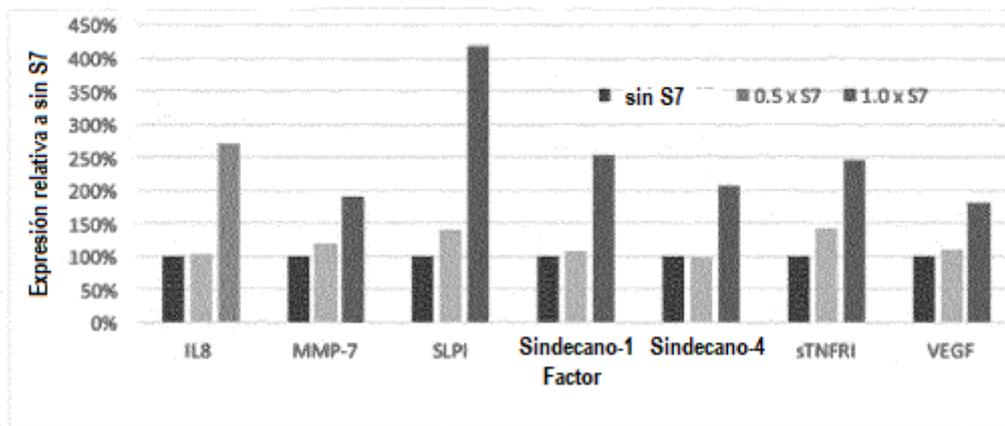


FIG. 7

Perfil SASP de células en senescencia replicativa

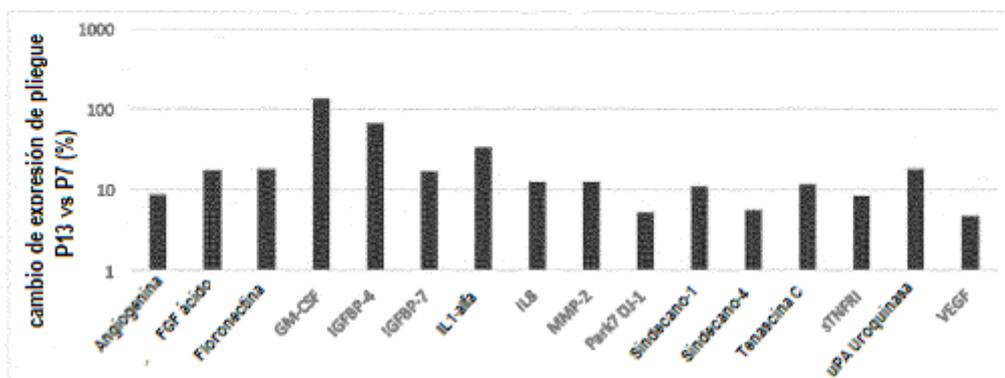


FIG. 8
Perfil SASP de células senescentes tratadas con t-BHP o Etanol

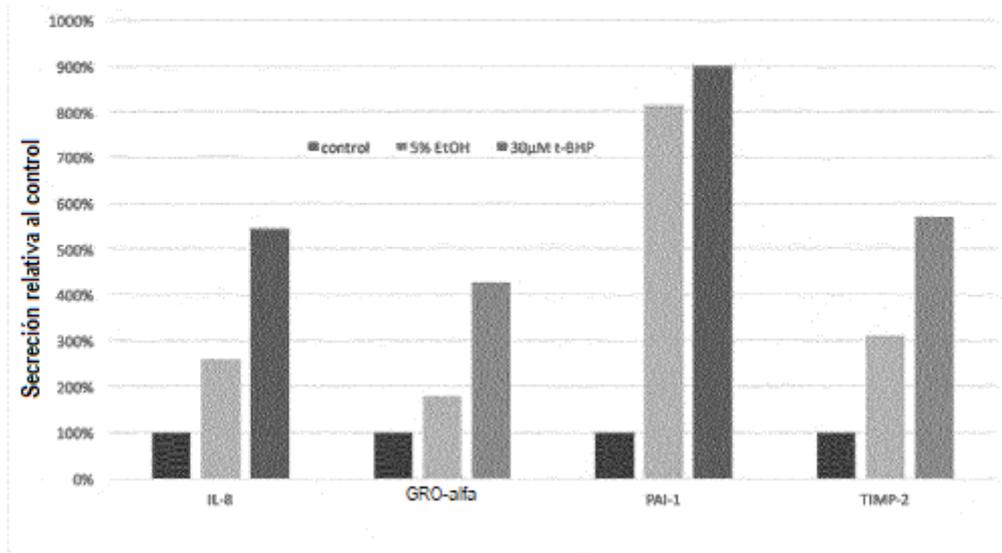


FIG. 9
Perfil SASP de células senescentes tratadas con surfactante

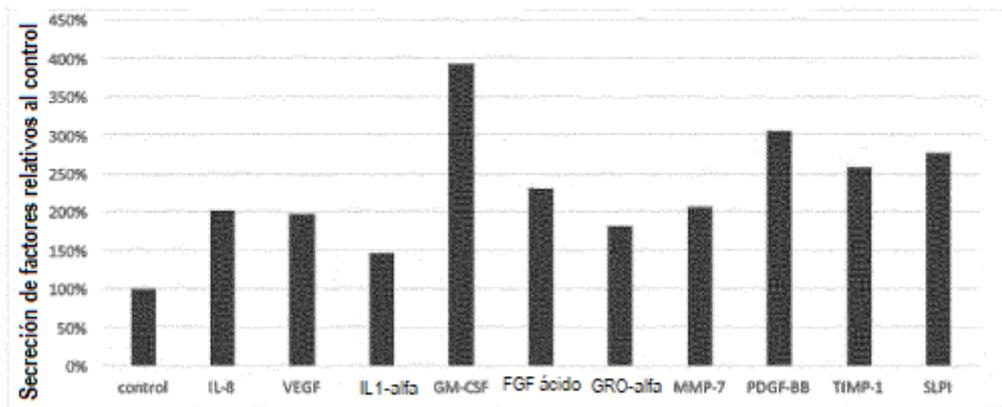


FIG. 10
Tinción con β -galactosidasa de fibroblastos irradiados

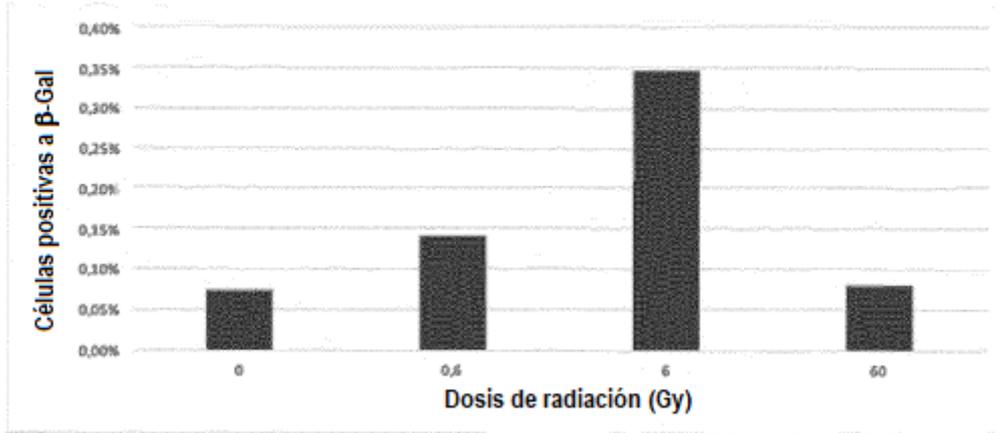


FIG. 11
Perfil SASP de células tratadas con Mitomicina C

Tratamiento	Tipo de células	Mitomicina (µM)	Células positivas a β-Gal	Secreción de pliegues en comparación con el control (mitomicina 0 µM)																	
				Angiogenina	FGF ácido	IGFBP-4	IL-1α	IL-6	IL-8	MMP-2	SLPI	Síndecano-4	TIMP-1								
Único	SCRN 10M1	0	6.6%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
		0,05	16,3%	1,5	1,1	1,1	1,0	1,0	0,7	1,2	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		
		0,2	12,9%	0,8	1,0	0,8	0,9	1,1	1,3	0,9	0,9	0,8	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		
		2	4,8%	0,9	1,1	0,8	1,2	1,8	2,5	1,1	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		
		0	1,5%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		0,05	2,0%	1,8	2,0	1,8	2,4	2,6	2,0	2,0	2,0	2,2	1,8	1,9	1,8	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	
	BMS1002	0,2	2,3%	0,6	0,8	0,5	0,6	0,8	0,5	0,8	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	0,7	
		2	3,4%	1,4	2,1	1,5	2,2	3,9	1,8	2,1	2,5	2,6	2,6	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9	
		0	10,2%	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
		0,2	10,2%	317,1	2,9	26,2	4,2	2,1	2,0	2,2	1,7	101,1	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	
		0,5	14,6%	360,9	3,9	26,0	7,9	5,1	5,6	3,7	6,5	269,4	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	
		1	27,1%	387,9	7,1	33,6	16,6	7,8	6,9	3,4	5,0	445,6	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	
Repetido	BMS1002	1	27,1%	387,9	7,1	33,6	16,6	7,8	6,9	3,4	5,0	445,6	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0		
		2	37,7%	396,2	6,8	34,6	15,9	8,2	13,7	3,6	6,3	254,9	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0		