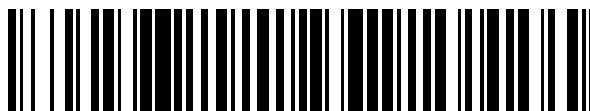


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 518**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01)

A61K 35/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009** **E 09795769 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013** **EP 2379085**

54 Título: **Preparación farmacéutica que comprende sobrenadante de cultivo de células mononucleares sanguíneas**

30 Prioridad:

18.12.2008 EP 08450198

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

15.11.2013

73 Titular/es:

**APOSCIENCE AG (100.0%)
Rauhensteingasse 4/3
1010 Wien, AT**

72 Inventor/es:

ANKERSMIT, HENDRIK JAN

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 429 518 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

Preparación farmacéutica que comprende sobrenadante de cultivo de células mononucleares sanguíneas.

La presente invención se refiere a una preparación farmacéutica para tratar estados inflamatorios internos de la piel, preferiblemente estados internos de la piel asociados con isquemia.

- 5 La hipoxia, un estado de oxígeno reducido, puede producirse cuando los pulmones se ven comprometidos o se reduce el flujo sanguíneo. La isquemia, reducción en el flujo sanguíneo, puede estar provocada por la obstrucción de una arteria o vena por un coágulo sanguíneo (trombo) o por cualquier materia extraña circulante (émbolo) o por un trastorno vascular tal como aterosclerosis. La reducción en el flujo sanguíneo puede tener una aparición repentina y corta duración (isquemia aguda) o puede tener una aparición lenta con larga duración o recurrencia frecuente (isquemia crónica). La isquemia aguda se asocia a menudo con necrosis de tejido regional, irreversible (un infarto), mientras que la isquemia crónica se asocia habitualmente con una lesión de tejido hipóxica transitoria. Sin embargo, si la disminución en la perfusión es prolongada o grave, la isquemia crónica también puede estar asociada con un infarto. Se producen comúnmente infartos en el bazo, riñón, pulmones, cerebro y corazón, produciendo trastornos tales como infarto intestinal, infarto pulmonar, accidente cerebrovascular isquémico e infarto de miocardio.
- 10
- 15 Los cambios patológicos en trastornos isquémicos dependen de la duración y gravedad de la isquemia, y de la duración de la supervivencia del paciente. Puede observarse necrosis dentro del infarto en las primeras 24 h y se desarrolla una respuesta inflamatoria aguda en el tejido viable adyacente al infarto, migrando leucocitos a la zona de tejido muerto. A lo largo de los días posteriores, existe una degradación gradual y eliminación de células dentro del infarto mediante fagocitosis y sustitución por una cicatriz de colágeno o glial.
- 20 La hipoperfusión o el infarto en un órgano afecta a menudo a otros órganos. Por ejemplo, la isquemia del pulmón, provocada, por ejemplo, por una embolia pulmonar, no sólo afecta al pulmón, sino que también pone el corazón y otros órganos, tales como el cerebro, bajo estrés hipóxico. El infarto de miocardio, que implica a menudo bloqueo de la arteria coronaria debido a trombosis, vasospasmos de la pared arterial o infección viral del corazón, puede conducir a insuficiencia cardíaca congestiva e hipotensión sistémica. Pueden desarrollarse complicaciones secundarias tales como encefalopatía isquémica global si el paro cardíaco se prolonga con hipoperfusión continuada. La isquemia cerebral, provocada de la manera más común por oclusión vascular debida a aterosclerosis, puede variar en gravedad de ataques isquémicos transitorios (TIA) a infarto cerebral o accidente cerebrovascular. Aunque los síntomas de los TIA son temporales y reversibles, los TIA tienden a repetirse y a menudo van seguidos por un accidente cerebrovascular.
- 25
- 30 La enfermedad arterial oclusiva incluye enfermedad de la arteria coronaria, que puede conducir a infarto de miocardio, y enfermedad arterial periférica, que puede afectar a la aorta abdominal, sus ramificaciones principales y arterias de las piernas. La enfermedad arterial periférica incluye enfermedad de Buerger, enfermedad de Raynaud y acrocianosis. Aunque la enfermedad arterial periférica está provocada comúnmente por aterosclerosis, otras causas principales incluyen, por ejemplo, diabetes, etc. Las complicaciones asociadas con la enfermedad arterial periférica incluyen calambres graves en las piernas, angina, ritmos cardíacos anómalos, insuficiencia cardíaca, ataque al corazón, accidente cerebrovascular e insuficiencia renal.
- 35
- Los trastornos isquémicos e hipóxicos son una causa principal de morbilidad y mortalidad. Las enfermedades cardiovasculares son responsables del 30% de los fallecimientos en todo el mundo. Entre las diversas enfermedades cardiovasculares, la cardiopatía isquémica y las enfermedades cerebrovasculares provocan aproximadamente el 17% de los fallecimientos.
- 40
- Actualmente, el tratamiento de trastornos isquémicos e hipóxicos se centra en el alivio de los síntomas y el tratamiento de trastornos causales. Por ejemplo, los tratamientos para el infarto de miocardio incluyen nitroglicerina y analgésicos para controlar el dolor y aliviar la carga de trabajo del corazón. Se usan otros medicamentos, incluyendo digoxina, diuréticos, amrinona, betabloqueantes, agentes hipolipemiantes e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, para estabilizar el estado, pero ninguna de estas terapias se ocupa directamente del daño al tejido producido por la isquemia y la hipoxia.
- 45
- Debido a las deficiencias en los tratamientos actuales, sigue habiendo una necesidad de métodos que sean eficaces en el tratamiento de estados que implican hipoxia. También existe la necesidad de métodos que sean eficaces en la prevención de daño al tejido provocado por isquemia que se produce debido a, por ejemplo, aterosclerosis, diabetes y trastornos pulmonares.
- 50
- Los estados asociados con isquemia e hipoxia van acompañados habitualmente de inflamación. Por tanto, se necesitan medios y métodos que también reduzcan la inflamación.
- Es un objeto de la presente invención proporcionar medios que permitan el tratamiento eficaz de estados inflamatorios, preferiblemente estados asociados con isquemia.
- 55 La presente invención se refiere a una preparación farmacéutica tópica para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel, preferiblemente un estado de la piel asociado con isquemia, que comprende un sobrenadante

de una disolución fisiológica que puede obtenerse mediante el cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o un subconjunto de las mismas en una disolución fisiológica libre de sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC durante al menos 1 h.

5 Resultó que la administración de una preparación farmacéutica tal como se definió anteriormente a un paciente que presentaba un estado inflamatorio de la piel, preferiblemente un estado de la piel asociado con isquemia, da como resultado un alivio de los síntomas respectivos y un proceso de curación.

10 La preparación farmacéutica de la presente invención comprende el sobrenadante de PBMC cultivadas o un subconjunto de las mismas. En el transcurso del cultivo de PBMC, estas células expresan y secretan sustancias como citocinas que difieren de las expresadas y secretadas en PBMC activadas. Esto significa que el secretoma de las PBMC de la presente invención es diferente del secretoma de PBMC activadas. Las células de la presente invención experimentan una producción de secretoma desencadenada por un resto de superficie no celular. Por tanto, es sorprendente que el sobrenadante de las PBMC que no se han puesto en contacto con sustancias de activación de PBMC como PHA o LPS pueda emplearse para tratar estados inflamatorios de la piel, lo que muestra que el secretoma de estas células comprende sustancias que soportan el tratamiento de dichos estados. El sobrenadante es particularmente adecuado para tratar un estado isquémico de la piel.

15 El sobrenadante de PBMC según la presente invención puede obtenerse mediante el cultivo de las mismas en una disolución fisiológica que no comprende sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC. Sin embargo, las PBMC se incuban en la disolución fisiológica durante al menos 1 h. Se requiere este tiempo de cultivo mínimo para dejar que las PBMC secreten citocinas y otras sustancias beneficiosas.

20 Las PBMC que forman parte de la preparación según la presente invención pueden obtenerse de sangre completa usando métodos conocidos en la técnica tales como gradiente de Ficoll, lisis hipotónica, etc. Estos métodos se conocen ampliamente en la técnica.

Las PBMC de la preparación farmacéutica pueden obtenerse de una reserva de donantes o del mismo individuo al que se le administrará la preparación.

25 La disolución fisiológica de la que se obtiene el sobrenadante comprende al menos 500, preferiblemente al menos 1000, más preferiblemente al menos 10^5 , incluso más preferiblemente al menos 10^6 , células por ml de disolución o por unidad de dosificación.

“Disolución fisiológica”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una disolución líquida en la que las PBMC se cultivan antes de su uso en la preparación farmacéutica según la presente invención.

30 “Disolución fisiológica” se refiere también a una disolución que no conduce a la muerte de las PBMC en el plazo de una hora, preferiblemente en el plazo de 30 min. Si el número de PBMC viables está disminuyendo en una disolución en el 75%, más preferiblemente en el 90% en el plazo de una hora, preferiblemente en el plazo de 30 min., no se considera que la disolución sea una “disolución fisiológica” tal como se define en el presente documento. La “disolución fisiológica” no conduce a una lisis espontánea de las PBMC cuando se ponen en contacto con dicha disolución.

35 En este contexto, la etapa de “cultivar” o “cultivo” comprende o consiste en la etapa de “incubación”, una etapa en la que las células se ponen en contacto con una disolución durante un tiempo definido (al menos 1 h, preferiblemente al menos 4 h, más preferiblemente al menos 8 h, incluso más preferiblemente al menos 12 h) en condiciones que se usan regularmente para cultivar las PBMC.

40 El término “estado de la piel asociado con isquemia” en el contexto de la presente invención puede usarse de manera intercambiable con el término “estados isquémicos de la piel” e indica cualquier estado, enfermedad o trastorno en el que regiones del cuerpo humano o animal se ven privadas de un suministro de oxígeno adecuado dando como resultado daño o disfunción del tejido. Un estado patológico puede estar caracterizado por la reducción o supresión del riego sanguíneo dentro de la piel o parte de la misma, lo que puede estar provocado por la constricción u obstrucción de un vaso sanguíneo. Se hace referencia a tales estados colectivamente en el presente documento mediante el término “isquemia” o “estados de la piel relacionados con isquemia” o “estado de la piel relacionado con isquemia”. En la cardiopatía, por ejemplo, a menudo se usa isquemia para describir el músculo cardíaco que no está obteniendo la cantidad apropiada de sangre rica en oxígeno debido al estrechamiento o bloqueo de arterias coronarias. Los síntomas de la isquemia dependen del órgano que sea “isquémico”. Con el corazón, la isquemia a menudo da como resultado angina de pecho. En el cerebro, la isquemia puede dar como resultado un accidente cerebrovascular. Los estados de isquemia van acompañados de inflamación.

Los ejemplos no limitativos de estados patológicos de la piel que se relacionan con inflamación, en particular con isquemia, incluyen heridas, heridas crónicas, heridas de diabéticos, úlcera de la piel, psoriasis, etc.

55 A pesar de lo anterior, un estado patológico en el contexto de la invención puede estar caracterizado por daño o disfunción de células endoteliales, es decir herida. Ejemplos no limitativos de heridas que pueden tratarse mediante

el uso de la preparación según la presente invención son heridas crónicas, heridas de diabéticos, úlcera, quemaduras, enfermedad inflamatoria de la piel y enfermedad intestinal.

“Disolución fisiológica”, tal como se usa en el presente documento, es preferiblemente una disolución que presenta una presión osmótica que no conduce a la destrucción de las PBMC o subconjuntos de las mismas y puede administrarse directamente a un individuo.

El término “libre de sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC” se refiere a la disolución fisiológica que no comprende sustancias que activan las PBMC e inducen la proliferación de las PBMC o subconjuntos de las mismas. Estas sustancias incluyen PHA, LPS, etc.

Según una realización preferida de la presente invención, la enfermedad inflamatoria de la piel se selecciona del grupo que consiste en inflamación, inflamación inducida por hipoxia y enfermedad autoinmunitaria, preferiblemente psoriasis, acné, rosácea, pioderma gangrenoso, dermatitis, enfermedad de la piel atópica, dermatitis de contacto, dermatitis seborreica, eritema nodoso, enfermedad por infecciones de la piel provocada por infestaciones bacterianas, virales, fúngicas, parasitarias, picaduras, mordeduras y urticaria, y estados de la piel asociados con isquemia. Estados de la piel particularmente preferidos son estados de la piel asociados con isquemia.

Según una realización particularmente preferida de la presente invención el estado de la piel asociado con isquemia se selecciona del grupo que consiste en heridas, isquemia tisular, heridas crónicas, heridas de diabéticos, úlcera de la piel, quemaduras de la piel, colgajos de piel en cirugía plástica y regeneración de tejido tras injertos dentales.

El subconjunto de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) son preferiblemente células T, células B o células NK. Naturalmente, también es posible usar combinaciones de estas células: células T y células B; células T y células NK; células B y células NK; células T, células B y células NK. Se conocen métodos para proporcionar y aislar dichas células.

Resultó que sorprendentemente las PBMC de la presente invención pueden cultivarse en cualquier clase de disolución siempre que dicha disolución no comprenda sustancias que no son farmacéuticamente aceptables, conduzca a una muerte inmediata de las PBMC (tal como se definió anteriormente), active las PBMC y estimule la proliferación de las PBMC. Por tanto, la disolución que va a usarse presenta al menos propiedades osmóticas que no conducen a lisis de las PBMC. La disolución fisiológica es preferiblemente una disolución de sal fisiológica, preferiblemente una disolución de NaCl fisiológica, sangre completa, una fracción sanguínea, preferiblemente suero, o un medio de cultivo celular.

El medio de cultivo celular se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en RPMI, DMEM, X-vivo y Ultraculture.

Según una realización particularmente preferida de la presente invención, las células de la presente invención se cultivan en condiciones de inducción de estrés.

El término “en condiciones de inducción de estrés”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones de cultivo que conducen a células sometidas a estrés. Las condiciones que provocan estrés en las células incluyen, entre otras, calor, productos químicos, radiación, hipoxia, presión osmótica, etc.

El estrés adicional en las células de la presente invención conduce a un aumento adicional de la expresión y secreción de sustancias beneficiosas para tratar estados inflamatorios de la piel, en particular estados de la piel asociados con isquemia.

Según una realización preferida de la presente invención, las condiciones de inducción de estrés incluyen hipoxia, ozono, calor (por ejemplo, más de 2°C, preferiblemente más de 5°C, más preferiblemente más de 10°C, mayor que la temperatura de cultivo óptima de las PBMC, es decir 37°C), radiación (por ejemplo, radiación UV, radiación gamma), productos químicos, presión osmótica (es decir, condiciones osmóticas que están elevadas al menos el 10% en comparación con las condiciones osmóticas que se producen regularmente en un líquido corporal, en particular en sangre) o combinaciones de las mismas.

Si se usa radiación para someter a estrés las PBMC de la presente invención, las células se irradian preferiblemente con al menos 10 Gy, preferiblemente al menos 20 Gy, más preferiblemente al menos 40 Gy, mediante lo cual se usa preferiblemente como fuente cesio Cs-137.

Según una realización preferida de la presente invención, las PBMC no activadas o un subconjunto de las mismas se cultivan en un medio durante al menos 4 h, preferiblemente durante al menos 6 h, más preferiblemente durante al menos 12 h.

La preparación farmacéutica según la presente invención se administra por vía tópica. Por tanto, dicha preparación se proporciona preferiblemente como un gel, preferiblemente hidrogel, como una pomada, como un parche dérmico, como una matriz farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en una matriz de colágeno/elastina (véase, por ejemplo, Haslik W *et al.* J Plast Reconst Aesth Surg (2008): “Management of fullthickness skin defects in the hand

and wrist region: first longterm experiences with the dermal matrix Matriderm”), como una pasta, como una crema, como un polvo, como un linimento o como una loción.

5 Una preparación farmacéutica según la presente invención puede comprender excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes, estabilizadores, portadores, etc. Dependiendo de la forma de dosificación, la preparación según la presente invención comprende los componentes respectivos. El experto en la técnica conoce ampliamente métodos para preparar la misma.

Con el fin de aumentar el término de caducidad de la preparación según la presente invención la disolución a) o el sobrenadante b) se liofiliza. El experto en la técnica conoce ampliamente métodos para liofilizar tales preparaciones.

10 Antes de su uso, la preparación liofilizada puede ponerse en contacto con agua o una disolución acuosa que comprende tampones, estabilizadores, sales, etc.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una preparación tal como se definió anteriormente para la fabricación de un medicamento para tratar un estado inflamatorio de la piel, en particular un estado de la piel asociado con isquemia.

15 Aún otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar una preparación farmacéutica tópica tal como se da a conocer en el presente documento, que comprende las etapas de

a) proporcionar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o un subconjunto de las mismas,

b) cultivar las células de la etapa a) en una disolución fisiológica libre de sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC durante al menos 1 h,

c) aislar el sobrenadante de la etapa b), y

20 d) preparar la preparación farmacéutica usando el sobrenadante de la etapa c).

25 La preparación según la presente invención puede obtenerse mediante la incubación o el cultivo de PBMC en una disolución fisiológica durante al menos 1 h, preferiblemente al menos 4 h, más preferiblemente al menos 8 h, incluso más preferiblemente al menos 12 h. En el transcurso de esta etapa las PBMC comienzan a sintetizar y secretar sustancias que son útiles en el tratamiento de estados inflamatorios. Antes, después y en el transcurso de la etapa de cultivo, las células no se activan añadiendo sustancias de activación de PBMC como PHA o LPS. Tras la etapa de cultivo, se aíslan las células y/o el sobrenadante del cultivo que va a usarse adicionalmente en la preparación de la preparación farmacéutica final. Tal como se comentó anteriormente, la preparación farmacéutica puede comprender PBMC cultivadas, el sobrenadante del cultivo en el que se habían incubado dichas células o tanto las PBMC cultivadas como el medio de cultivo.

30 Según una realización preferida de la presente invención, las células se someten a condiciones de inducción de estrés antes de o en el transcurso de la etapa b), incluyendo dichas condiciones de inducción de estrés hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica (por ejemplo, inducida mediante la adición de sal, en particular NaCl, con el fin de proporcionar una presión osmótica mayor que la que hay en la sangre), desplazamiento de pH (es decir, cambio de pH mediante la adición de ácidos o hidróxidos para proporcionar un valor de pH de 6,5 a 7,2 o de 7,5 a 8,0) o combinaciones de las mismas.

35 Según una realización preferida de la presente invención, las células se irradian antes de o en el transcurso de la etapa b) con al menos 10 Gy, preferiblemente al menos 20 Gy, más preferiblemente al menos 40 Gy, con ozono, con temperatura elevada o con radiación UV.

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una preparación que puede obtenerse mediante un método tal como se describió anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para tratar estados inflamatorios de la piel, en particular estados de la piel asociados con isquemia mediante la administración a un individuo que lo necesita de una cantidad apropiada de la preparación farmacéutica según la presente invención.

45 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin embargo, sin restringirse a los mismos.

La figura 1 muestra el efecto de sobrenadantes (SN) de cultivo derivados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) sobre la migración celular en queratinocitos (KC) primarios humanos y fibroblastos (FB) dérmicos.

50 Se hicieron crecer KC y FB en medio de crecimiento de KC y DMEM (complementado con FBS al 10%), respectivamente. Tras alcanzar la confluencia, se raspó la monocapa celular con la punta de una pipeta y se cultivó adicionalmente con SN derivado de PBMC durante 16 h. Sólo pudo detectarse un pequeño efecto de SN procedente de PBMC vivas (LL) sobre KC, mientras que el SN de PBMC apoptóticas (APO) indujo fuertemente la migración de KC. En cambio, ambos SN (LL y APO) indujeron fuertemente la migración celular en FB dérmicos.

La figura 2 muestra el efecto de SN derivados de PBMC sobre la progresión del ciclo celular de KC y FB.

Se cultivaron KC y FB en proliferación en SN derivados de PBMC. Tras 24 h, se incubaron las células con BrdU durante 2 h y se trataron adicionalmente tal como se indicaba en el manual de usuario (kit de ciclo celular BrdU-FACS flow, BD Biosciences). Tal como se muestra en la figura 2, la estimulación de FB con SN derivados de PBMC condujo a una disminución de la población de células en proliferación acompañada de un aumento de las células en la fase G2/M. En cambio, se encontró un aumento significativo de KC en proliferación con ambos SN de LL y APO. Sin embargo, el efecto de SN derivado de células apoptóticas fue más pronunciado en KC.

La figura 3 muestra que SN derivados de PBMC potencian fuertemente la cicatrización de heridas *in vivo*.

Se aplicaron cremas que contenían SN de PBMC o bien LL (figura 3a, b) o bien APO (figura 3b) en heridas de biopsia de punción de 6 mm en los lomos de ratones B6/129 inmediatamente tras realizarse la herida. 8 días tras realizarse la herida, se sacrificaron los ratones y se analizaron las heridas mediante tinción con H&E. Tal como se muestra en las figuras 3a y 3b ambos SN potenciaron fuertemente la cicatrización de la herida en los compartimentos tanto dérmicos como epidérmicos de la piel.

La figura 4 muestra que SN derivados de PBMC potencian fuertemente la cicatrización de heridas *in vivo*.

Se midió el tamaño de la herida durante los primeros 5 días tras realizarse la herida hasta que se formó una costra. Tal como se muestra en la figura 4, se encontró que el cierre de la herida tras el tratamiento con cremas que contenían sobrenadantes derivados de PBMC era mucho más rápido en comparación con la crema sola durante la totalidad de los 5 días. Aunque el tamaño de la herida aumentaba algo durante los primeros 2 días con crema sola, las heridas tratadas con sobrenadantes derivados de PBMC comenzaron a cerrarse durante las primeras 24 h tras realizarse la herida y la aplicación de las cremas.

La figura 5 muestra el aumento de la angiogénesis en heridas de ratón *in vivo* tras el tratamiento con SN derivados de PBMC.

Mediante inmunohistoquímica para el factor VIII (figura 5a) y CD31 (figura 5b), ambos marcadores para vasos sanguíneos, se encontró un aumento masivo en células positivas para CD31 en heridas tratadas con SN en comparación con controles, indicativo del aumento de la angiogénesis, que podría contribuir a la cicatrización potenciada de heridas. En cambio, no pudo detectarse un aumento del número de células en proliferación en este punto de tiempo tal como se analizó mediante tinción con Ki67 (figura 5a).

La figura 6a muestra que ni las PBMC viables no estimuladas ni las IA-PBMC secretan la citocina proinflamatoria derivada de monocitos principalmente TNF- α . (Se indican las significaciones tal como sigue: * p=0,05, ** p=0,001; n=8)

La figura 6b demuestra una fuerte inducción de la secreción de interferón- γ proinflamatorio tras la activación en comparación con PBMC no estimuladas. (Se indican las significaciones tal como sigue: * p=0,05, ** p=0,001; n=8)

La figura 7a muestra resultados combinados de análisis de citometría de flujo. Se regularon las PBMC para células T y se evaluó la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25. (Se indican las significaciones tal como sigue: * p=0,05, ** p=0,001; n=4)

La figura 7b presenta visualmente un análisis de FACS representativo de PBMC activadas de cualquier manera (PHA, Acm contra CD3). La regulación representa el % de células positivas.

La figura 8 muestra altas tasas de proliferación tal como se midió mediante la incorporación de ^3H -timidina de PBMC estimuladas en comparación con PBMC viables cultivadas en RPMI sin estimulación.

La figura 9 muestra la inhibición de la respuesta de células T de secretomas de PBMC en ensayos de proliferación de células T.

La figura 10 muestra experimentos de estimulación con anticuerpo anti-CD3 y PHA realizados con PBMC.

La figura 11 muestra la proliferación de PBMC tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3, PHA y linfocitos mixtos.

La figura 12 muestra el nivel de positividad para PI y anexina V del sobrenadante de células CD4+ incubadas con sobrenadantes de PBMC.

La figura 13 muestra la inhibición de la regulación por incremento de CD25 y CD69 en células CD4+ por el sobrenadante de PBMC.

La figura 14 muestra que la disminución de IL-10 y TGF- β no aumentó las tasas de proliferación de células CD4+.

EJEMPLOS:**Ejemplo 1: Los sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de sangre periférica potencian fuertemente la cicatrización de heridas.**

Las úlceras de la piel que no cicatrizan son a menudo resistentes a los tratamientos más comunes. En un estudio previo, se mostró que la aplicación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) junto con factor de crecimiento de fibroblastos básico parecía ser un tratamiento útil para la gangrena diabética. En el presente ejemplo, se investigó si sobrenadantes de cultivo de PBMC (o bien no irradiados o bien irradiados) son suficientes para inducir una cicatrización potenciada de heridas en un modelo de ratón. Además, se analizó el efecto de estos sobrenadantes sobre fibroblastos (FB) primarios humanos, queratinocitos (KC) y células endoteliales (EC).

Mediante la incubación de FB y KC con sobrenadantes derivados de PBMC se encontró que los sobrenadantes tanto de células no irradiadas como irradiadas indujeron fuertemente la migración de FB, mientras que no tuvieron efecto sobre la proliferación de FB. En cambio, se mostró que ambos sobrenadantes eran eficaces sobre KC con respecto a su capacidad migratoria y proliferativa. Sin embargo, el efecto de los sobrenadantes derivados de células irradiadas fue mucho más pronunciado. Puesto que los sobrenadantes derivados de PBMC indujeron la maquinaria de migración y proliferación *in vitro*, se investigó adicionalmente si estos sobrenadantes también pueden inducir la cicatrización de heridas *in vivo*. Por tanto, se prepararon cremas que contenían sobrenadantes de PBMC y se aplicaron sobre heridas de biopsia de punción de 6 mm en los lomos de ratones B6/129 inmediatamente tras realizarse la herida. Se midió el tamaño de la herida durante los siguientes 4-5 días hasta que se formó una costra. Se encontró sorprendentemente que el cierre de la herida tras el tratamiento con las cremas que contenían sobrenadantes derivados de PBMC fue mucho más rápido en comparación con la crema sola durante la totalidad de los 5 días. De manera interesante, aunque el tamaño de la herida aumentó algo durante los primeros 2 días con crema sola, las heridas tratadas con sobrenadantes derivados de PBMC comenzaron a cerrarse durante las primeras 24 h tras realizarse la herida y la aplicación de las cremas. 8-10 días tras realizarse la herida, se sacrificaron los ratones y se analizaron las heridas mediante tinción con H&E y mediante inmunohistoquímica para el CD31, un marcador para vasos sanguíneos. La tinción con H&E reveló que la cicatrización de la herida en compartimentos tanto dérmicos como epidérmicos de la piel fue mucho más avanzada en presencia de cremas de sobrenadantes derivados de PBMC. Además, hubo un aumento masivo en las células positivas para CD31 en tales heridas, indicativo del aumento de la angiogénesis, que podría contribuir a la cicatrización potenciada de heridas.

En resumen, se mostró que los sobrenadantes derivados de PBMC condujeron a una cicatrización potenciada de heridas en ratones *in vivo* y que estos sobrenadantes también indujeron proliferación y migración en células humanas *in vitro*. La formulación de las cremas que contenían sobrenadantes de PBMC podría representar una gran ventaja para el tratamiento de úlceras de la piel que no cicatrizan (véanse las figuras 1 a 5).

Ejemplo 2: Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en reposo evidencian marcador de baja activación y producción reducida de citocinas inflamatorias

Se supone que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) activadas y sus sobrenadantes (SN) son beneficiosos en la regeneración de heridas (Holzinger C *et al.* Eur J Vasc Surg. mayo de 1994; 8(3): 351-6). En los ejemplos 1 y 2, pudo mostrarse que PBMC no activadas y SN derivados de las mismas tienen efectos beneficiosos en un modelo experimental de cicatrización de heridas e infarto de miocardio agudo (AMI). Puesto que la no activación de PBMC tenía que verificarse experimentalmente, se investigó si el cultivo de PBMC conduce a marcadores de activación de células T (CD69, CD25) potenciados o secreción potenciada de citocinas inflamatorias (activación de monocitos=TNF α , activación de células T= INF γ). En un experimento de control, se activaron células T cultivadas mediante estimulación con el Acm contra CD3 o fitohemaglutinina (PHA).

Métodos y resultados

Se extrajo sangre venosa en tubos de EDTA de voluntarios sanos. Tras separación mediante grado de densidad en Ficoll-Hypaque, se recogieron las PBMC y se dividieron en células viables y apoptóticas irradiadas (IA-PBMC). Para obtener células apoptóticas, se irradiaron PBMC con 60 Gy (cesio-137). Para el análisis de citometría de flujo, se cultivaron 500.000 PBMC en 200 μ l de medio libre de suero. O bien se estimularon las células con PHA (7 μ g/ml) o Acm contra CD3 (10 μ g/ml) o bien se dejaron sin estimular. Tras 24 h de incubación, se lavaron las células, se tiñeron para CD3, CD69 y CD25 (R&D System) y se evaluaron para determinar marcadores de activación de superficie en un aparato FC500 (Coulter). Para ensayos de ELISA, se cultivaron PBMC durante la noche a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/ml, o bien con o bien sin estimulación con PHA o CD3. Tras 24 h, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -20°C. Se adquirieron kits para ELISA disponibles comercialmente para TNF- α (R&D) e INF- γ (Bender). Brevemente, se recubrieron placas MaxiSorp con anticuerpos contra TNF- α e INF- γ y se almacenaron durante la noche. Tras 24 h, se lavaron las placas y se añadieron muestras por duplicado a cada pocillo. Tras la incubación y adición de un anticuerpo de detección y estreptavidina-HRP, se añadió el sustrato de TMB a cada pocillo. Tras el desarrollo de color, se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de ácido sulfúrico. Se leyeron los valores de densidad óptica en un lector de placas Victor3 de Wallac.

Resultados:

Análisis de FACS: las células T estimuladas con CD3 y PHA mostraron una regulación por incremento de los marcadores de activación CD69 y CD25 tras 24 h de incubación. Las células no estimuladas y apoptóticas expresaron sólo bajas cantidades de CD69 y CD25 (figura 6a (muestra representativa, figura 6b, histograma, n=4). La significación estadística se indica mediante asteriscos (** p<0,001, * p<0,05). Análisis de ELISA: aunque no se detectaron ni TNF- α ni INF- γ en sobrenadantes derivados de PBMC no estimuladas, los sobrenadantes de PBMC estimuladas con PHA o CD3 evidenciaron altos valores para estas citocinas tal como se indica por el análisis de ELISA (asteriscos ** p<0,001, * p<0,05, n=8). Los resultados muestran claramente un patrón de secreción diferente de citocinas inflamatorias en comparación con PBMC no estimuladas.

Conclusión:

Estos datos indican que las "PBMC no estimuladas" evidencian un fenotipo definido diferente (marcador de activación, secreción de citocinas) en comparación con las PBMC estimuladas (PHA y Acm contra CD3).

La figura 6a indica que ni las PBMC viables no estimuladas ni las IA-PBMC secretan la citocina proinflamatoria derivada de monocitos principalmente TNF- α . (Se indican las significaciones tal como sigue: * p=0,05, ** p=0,001; n=8)

La figura 6b demuestra una fuerte inducción de la secreción de interferón- γ proinflamatorio tras la activación en comparación con PBMC no estimuladas. (Se indican las significaciones tal como sigue: * p=0,05, ** p=0,001; n=8)

La figura 7a muestra resultados combinados de análisis de citometría de flujo. Se regularon las PBMC para células T y se evaluó la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25. (Se indican las significaciones tal como sigue: * p=0,05, ** p=0,001; n=4)

La figura 7b presenta visualmente un análisis de FACS representativo de PBMC activadas de cualquier manera (PHA, Acm contra CD3). La regulación representa el % de células positivas.

Ejemplo 3: Actividad proliferativa de PBMC cultivadas en una disolución fisiológica

El objetivo de este ejemplo es demostrar que las PBMC no tienen actividad proliferativa en comparación con ensayos inmunitarios que utilizan la activación específica (CD3), no específica (lectina, PHA) y alogénica de células T (reacción de linfocitos mixtos, P9LR) en un ensayo de estimulación de 2 días (CD3, PHA) y 5 días (MLR).

Material y métodos

Se separaron las PBMC de voluntarios sanos jóvenes mediante centrifugación en gradiente en densidad de Ficoll y se resuspendieron en RPMI (Gibco, EE.UU.) que contenía sulfato de gentamicina al 0,2% (Sigma Chemical Co, EE.UU.), L-glutamina al 1% (Sigma, EE.UU.) a 1×10^5 células por 200 μ l. Se estimularon las células que respondieron o bien mediante Acm contra CD3 (10 μ g/ml, BD, NJ, EE.UU.), PHA (7 μ l/ml, Sigma Chemical Co, EE.UU.) o bien con PBMC alogénicas irradiadas a una razón 1:1 (para MLR). Se incubaron las placas durante 48 h o 5 días y luego se pulsaron durante 18 h con 3[H]-timidina ($3,7 \times 10^1$ Bq/pocillo; Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Se recogieron las células y se midió la incorporación de 3[H]-timidina en un contador de centelleo líquido.

Resultados:

Las PBMC estimuladas mostraron altas tasas de proliferación tal como se midió mediante la incorporación de 3[H]-timidina en comparación con PBMC viables cultivadas en RPMI sin estimulación (figura 8). Se observó este efecto mediante la adición de estímulos específicos de células T (PHA, CD3) así como en ensayos en los que se desencadenó la proliferación mediante células presentadoras de antígeno (MLR).

Conclusión:

Este conjunto de experimentos implica que PBMC viables mantenidas en cultivo durante hasta 5 días no proliferan mientras que PBMC estimuladas de diferentes maneras mostraron una respuesta proliferativa notable. Se concluye que el cultivo de PBMC sin estimulación no conduce a respuesta proliferativa.

Ejemplo 4: Los secretomas de PBMC separadas mantenidas en condiciones de cultivo estériles presentan capacidad neo-angiogénica.

Puesto que la neo-angiogénesis y la inflamación están fuertemente vinculadas *in vivo*, se investigó si estos secretomas de PBMC también presentan efectos antiproliferativos sobre células T y por tanto interfieren en una respuesta inmunitaria inflamatoria.

Material y métodos

Se obtuvieron los secretomas mediante la incubación de PBMC ($2,5 \times 10^6$ /ml) de voluntarios sanos jóvenes, se separaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll durante 24 h en RPMI (Gibco, CA, EE.UU.) que contenía sulfato de gentamicina al 0,2% (Sigma Chemical Co, EE.UU.), L-glutamina al 1% (Sigma, EE.UU.). Se separaron los sobrenadantes de la fracción celular y se almacenaron a -80°C . Para los ensayos de proliferación, se resuspendieron PBMC alogénicas a 1×10^5 células por 200 μl de RPMI tras la separación. Se estimularon las células que respondieron mediante o bien Acm contra CD3 (10 $\mu\text{g/ml}$, BD, EE.UU.), o bien PHA (7 $\mu\text{l/ml}$, Sigma Chemical Co, EE.UU.). Se añadieron diferentes diluciones de los sobrenadantes. Se incubaron las placas durante 48 h y entonces se pulsaron durante 18 h con $^3\text{[H]}$ -timidina ($3,7 \times 10^4$ Bq/pocillo; Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Se recogieron las células y se midió la incorporación de $^3\text{[H]}$ -timidina en un contador de centelleo líquido.

Resultados:

Los secretomas de PBMC alogénicas evidenciaron una reducción significativa de las tasas de proliferación medidas mediante la incorporación de $^3\text{[H]}$ -timidina en comparación con controles positivos (figura 9). Este efecto era dependiente de la dosis y pudo observarse tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3 así como tras la estimulación con PHA.

Implicación:

Este conjunto de experimentos implica que los secretomas obtenidos a partir de PBMC viables mantenidas en cultivo durante 24 h presentan efectos antiproliferativos significativos *in vitro*. Estos datos indican que el sobrenadante derivado de PBMC o en forma liofilizada puede servir como posible fórmula terapéutica para tratar enfermedades humanas que están relacionadas con inflamación inducida por hipoxia u otras enfermedades hiperinflamatorias (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias de la piel).

Ejemplo 5 Los factores paracrinós secretados por células mononucleares de sangre periférica presentan características de inmunosupresión

En el ejemplo 1, se evidencian los efectos antiinflamatorios de secretomas de PBMC en un modelo animal de infarto de miocardio agudo (AMI). En este ejemplo, se muestra que la aplicación de secretomas de PBMC tras inducción de AMI inhibe el daño inflamatorio del músculo cardíaco mediante regulación por disminución de manera masiva de la respuesta inmunitaria.

Basándose en estos hallazgos, se investigaron los posibles efectos de inmunosupresión de los secretomas en experimentos *in vitro*. Las células CD4⁺ desempeñan un papel clave en la orquestación de la respuesta inmunitaria ya que son fundamentales para la asistencia de otros leucocitos (por ejemplo, macrófagos, células B, células T citotóxicas) en procesos inmunológicos.

Material y métodos

Producción de secretomas de PBMC

Se separaron PBMC de voluntarios sanos mediante centrifugación por densidad de Ficoll. Se resuspendieron las células en medio Ultra Culture (Lonza, Basilea, Suiza) a una concentración de 1×10^6 células/ml (sup liv). Para la producción de secretomas a partir de PBMC apoptóticas, se indujo apoptosis mediante irradiación con 60 Gy (sup APA). Se incubaron las células durante 24 h en una atmósfera humidificada (5% de CO_2 , 37°C , humedad relativa del 95%). Se retiraron los sobrenadantes y se dializaron con un punto de corte de 3,5 kDa (Spectrum laboratories, Breda, Países Bajos) frente a acetato de amonio 50 mM durante la noche a 4°C . Entonces se sometieron los sobrenadantes a filtración estéril y se liofilizaron. Se almacenaron los secretomas liofilizados a -80°C y se resuspendieron nuevamente para cada experimento. Se tomaron muestras al azar de los secretomas para determinar su valor de pH.

Separación de células CD4

Se separaron las células CD4⁺ mediante reducción de células T no CD4⁺ utilizando un sistema de perlas para MACS (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Alemania). Se prepararon nuevamente células y se usaron inmediatamente para cada experimento.

Medición de la apoptosis

Se detectó apoptosis mediante citometría de flujo usando un kit para anexina V/PI disponible comercialmente (BD, Nueva Jersey, EE.UU.). Se definió apoptosis mediante tinción positiva para anexina, apoptosis tardía mediante positividad para PI.

Experimentos de proliferación

Se diluyeron PBMC o células CD4⁺ purificadas en Ultra Culture complementado con sulfato de gentamicina al 0,2% (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), R-mercapto-etanol al 0,5% (Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) y GlutaMAX-I al 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) hasta una concentración de 1×10^5 /pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Se estimularon las células con o bien PHA (7 µg/ml, Sigma, EE.UU.), CD3 (10 µg/ml, BD, Nueva Jersey, EE.UU.), IL-2 (10 U/ml, BD, EE.UU.) o bien una razón 1:1 de PBMC alogénicas irradiadas (60 Gy) para MLR. Se incubaron las células durante 48 h o 5 días (MLR) con diferentes concentraciones de secretomas de PBMC, IL-10 o TGF-β. Entonces se pulsaron las células durante 18 h con 3[H]-timidina ($3,7 \times 10^4$ Bq/pocillo; Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se recogieron las células y se midió la incorporación de 3[H]-timidina en un contador de centelleo líquido.

Marcadores de activación

Se estimularon células CD4⁺ purificadas con anticuerpo anti-CD3 (10 µg/ml) y se incubaron conjuntamente con diferente concentración de secretomas de PBMC. Se tiñeron las células para CD69 y CD25 siguiendo un protocolo de tinción de citometría de flujo convencional y se analizaron en un citómetro de flujo FC500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.).

Resultados

En experimentos preliminares, se sometieron a prueba las propiedades antiproliferativas de sobrenadantes de PBMC procedentes de células viables (sup liv). En los experimentos de estimulación con anticuerpo anti-CD3 y PHA, se redujeron significativamente las tasas de proliferación mediante la adición de secretomas (n=10).

Basándose en estos hallazgos, se evaluó el efecto de secretomas de PBMC sobre el compartimento de células T cooperadoras, puesto que estas células desempeñan un papel fundamental en el lanzamiento y la perpetuación de una respuesta inmunitaria. Por analogía con la figura 10, células CD4⁺ altamente purificadas pierden su capacidad proliferativa mediante la adición de secretomas. Se observó este fenómeno para el sobrenadante de PBMC vivas así como de apoptóticas, irradiadas (figura 11, n=5).

La siguiente etapa fue determinar posibles efectos de los secretomas sobre la viabilidad celular. Por tanto, se incubaron células CD4⁺ en reposo con sobrenadante y se evaluó la positividad para anexina V y PI. Los sobrenadantes de PBMC tanto vivas como apoptóticas evidenciaron efectos proapoptóticos notables (figura 12, n=5).

Para someter a prueba si los secretomas de PBMC podían inhibir la activación de células CD4⁺, se evaluó la activación de los marcadores de activación de células T CD25 y CD69 tras la estimulación con anticuerpo anti-CD3 de células CD4⁺. Se inhibió significativamente, y de manera dependiente de la dosis, la regulación por incremento de ambos marcadores, por los secretomas de PBMC (figura 13, n=5).

En un último conjunto de experimentos, se examinó el efecto de las citocinas inmunosupresoras IL-10 y TGF-β mediante la adición de anticuerpos neutralizantes en estos experimentos. Se encontró que ni IL-10 ni TGF-β eran responsables de los efectos antiproliferativos de estos secretomas de PBMC, puesto que la disminución de estas citocinas no aumentó las tasas de proliferación (figura 14, n=5).

Conclusión

Estos experimentos evidencian por primera vez que los secretomas de PBMC presentan características inmunosupresoras *in vitro*. Se mostró que el sobrenadante a) reduce las tasas de proliferación en experimentos de estimulación con anticuerpo anti-CD3, PHA y MLR, b) tiene la potencia para inducir apoptosis e inhibe la activación de células CD4⁺ tras la activación de células T.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Preparación farmacéutica tópica para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel, preferiblemente un estado asociado con isquemia, que comprende un sobrenadante de una disolución fisiológica que puede obtenerse mediante el cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o un subconjunto de las mismas en una disolución fisiológica libre de sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC durante al menos 1 h.
- 10 2. Preparación para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho estado se selecciona del grupo que consiste en heridas, isquemia tisular, heridas crónicas, heridas de diabéticos, úlcera de la piel, quemaduras de la piel, colgajos de piel en cirugía plástica y regeneración de tejido tras injertos dentales.
- 15 3. Preparación para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque el subconjunto de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) es de células T, células B o células NK.
4. Preparación para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la disolución fisiológica es una disolución de sal fisiológica, preferiblemente una disolución de NaCl fisiológica, sangre completa, una fracción sanguínea, preferiblemente suero o un medio de cultivo celular.
- 20 5. Preparación para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel según la reivindicación 4, caracterizada porque el medio de cultivo celular se selecciona del grupo que consiste en RPMI, DMEM, X-vivo y Ultraculture.
- 25 6. Preparación para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque las células se cultivan en condiciones de inducción de estrés.
7. Preparación para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel según la reivindicación 6, caracterizada porque las condiciones de inducción de estrés incluyen hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica, desplazamiento de pH o combinaciones de los mismos.
- 30 8. Preparación para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque las PBMC o un subconjunto de las mismas se someten a estrés durante el cultivo con al menos 10 Gy, preferiblemente al menos 20 Gy, más preferiblemente al menos 40 Gy, con ozono, con temperatura elevada o con radiación UV.
- 35 9. Preparación para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, estando dicha preparación caracterizada porque se proporciona como un gel, preferiblemente hidrogel, como una pomada, como un parche dérmico, como una matriz farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en una matriz de colágeno/elastina, como una pasta, como una crema, como un polvo, como un linimento o como una loción.
- 40 10. Preparación para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizada porque el sobrenadante se liofiliza.
11. Preparación para su uso en el tratamiento de un estado inflamatorio de la piel según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizada porque las PBMC o un subconjunto de las mismas se cultivan en dicha disolución durante al menos 4 h, preferiblemente durante al menos 6 h, más preferiblemente durante al menos 12 h.
- 45 12. Uso de una preparación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para la fabricación de un medicamento para tratar un estado inflamatorio de la piel, preferiblemente un estado asociado con isquemia.
13. Método para preparar una preparación farmacéutica tópica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende las etapas de
 - a) proporcionar células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o un subconjunto de las mismas,
 - b) cultivar las células de la etapa a) en una disolución fisiológica libre de sustancias de proliferación de PBMC y de activación de PBMC durante al menos 1 h,
 - 50 c) aislar el sobrenadante de la etapa b), y
 - d) preparar la preparación farmacéutica usando el sobrenadante de la etapa c).

5

14. Método según la reivindicación 13, caracterizado porque las células se someten a condiciones de inducción de estrés antes de o en el transcurso de la etapa b), en el que dichas condiciones de inducción de estrés incluyen hipoxia, ozono, calor, radiación, productos químicos, presión osmótica, desplazamiento de pH o combinaciones de los mismos.

15. Método según la reivindicación 13 ó 14, caracterizado porque las células se irradian antes de o en el transcurso de la etapa b) con al menos 10 Gy, preferiblemente al menos 20 Gy, más preferiblemente al menos 40 Gy, con ozono, con temperatura elevada o con radiación UV.

16. Preparación farmacéutica que puede obtenerse mediante un método según una cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 15.

Queratinocitos

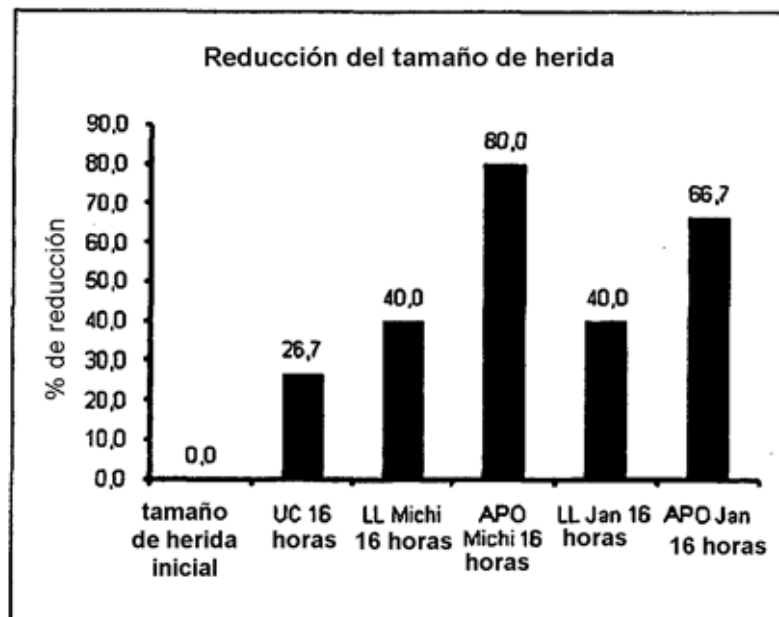
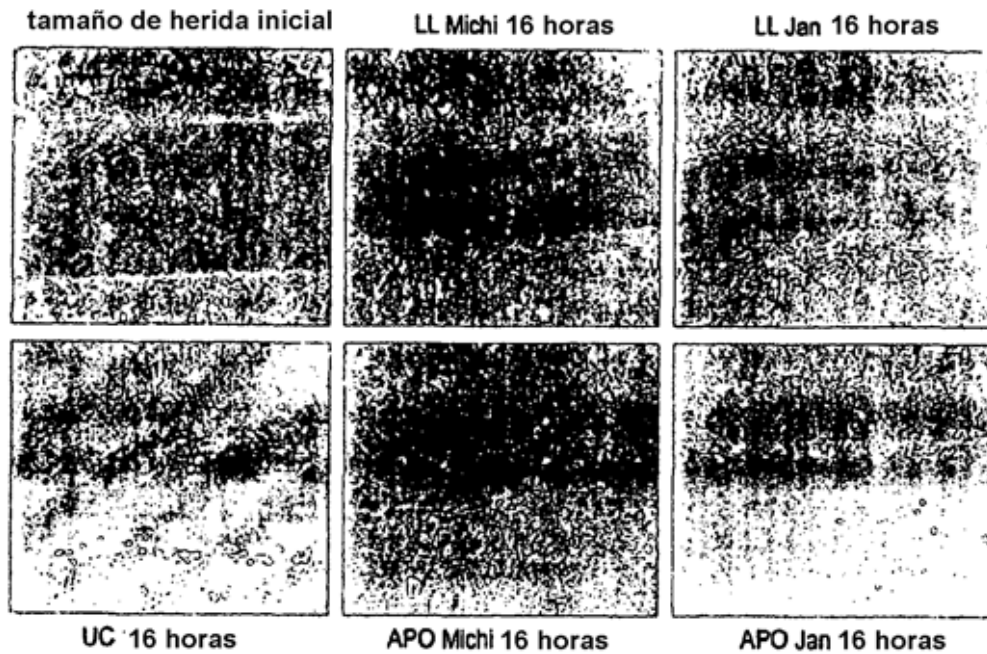


Fig. 1

Fibroblastos

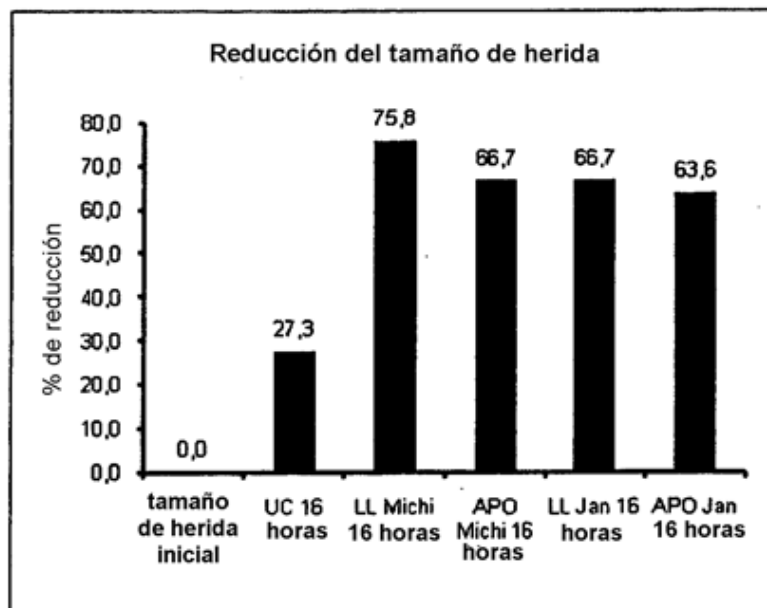
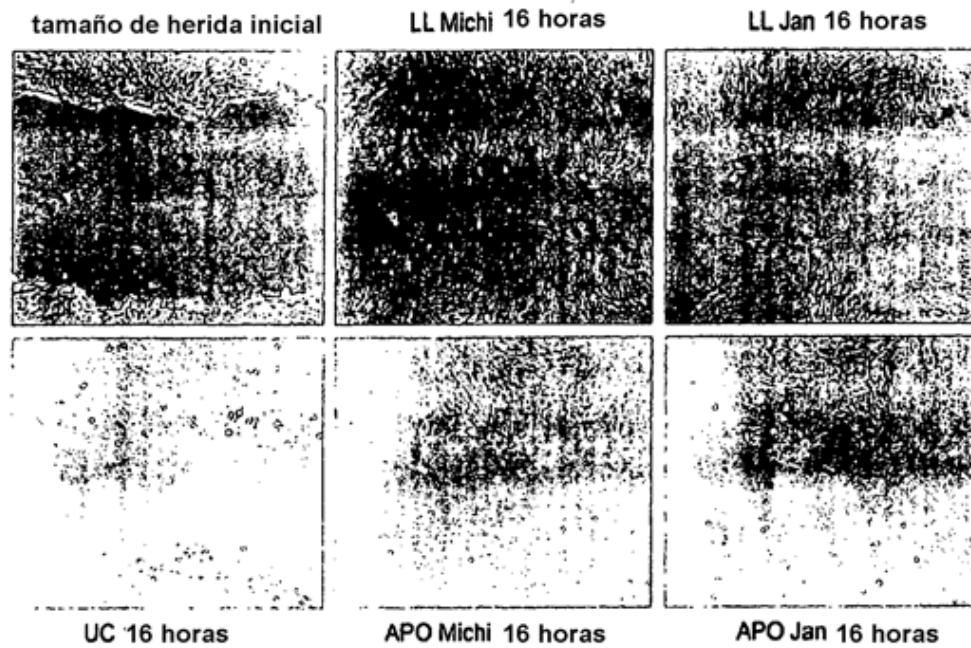


Fig. 1 (continuación)

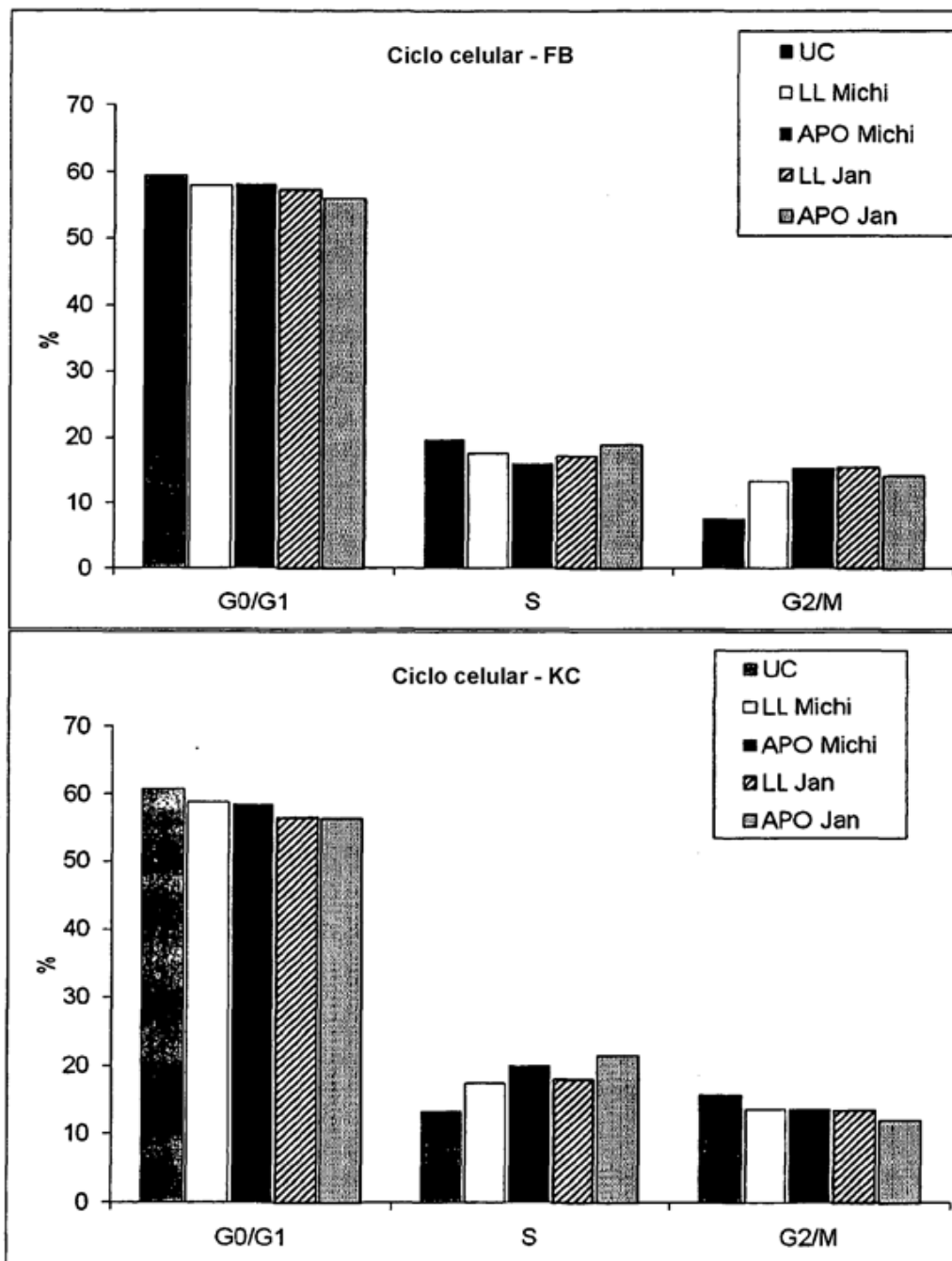


Fig. 2

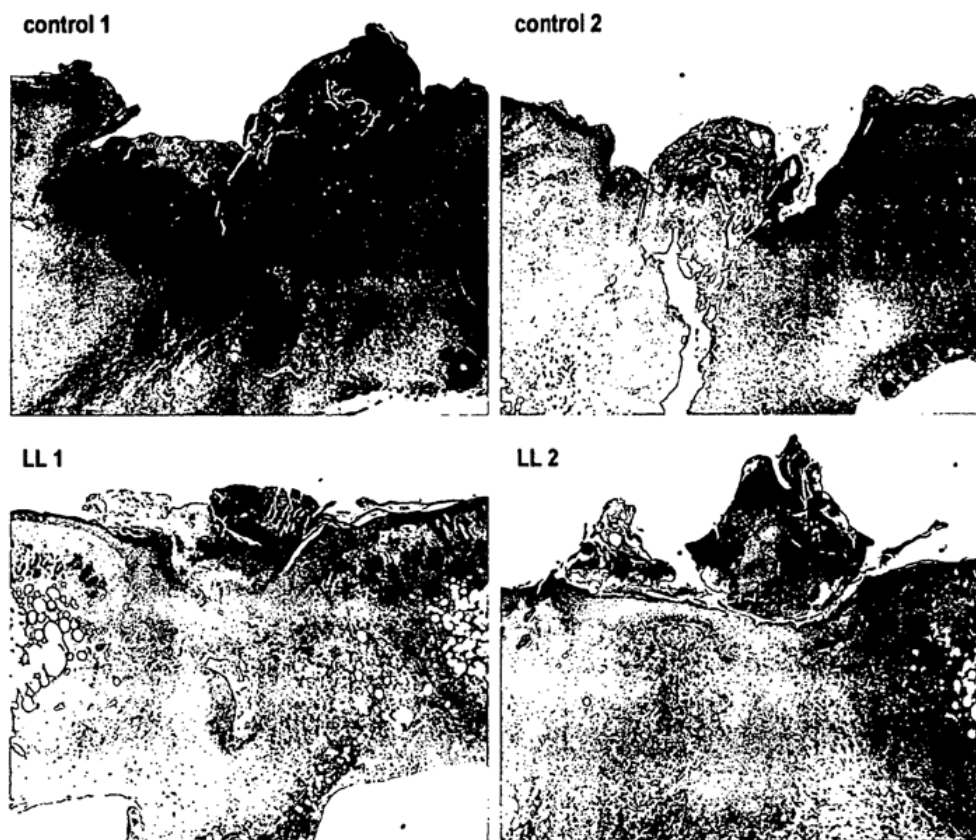


Fig. 3a



Fig. 3b

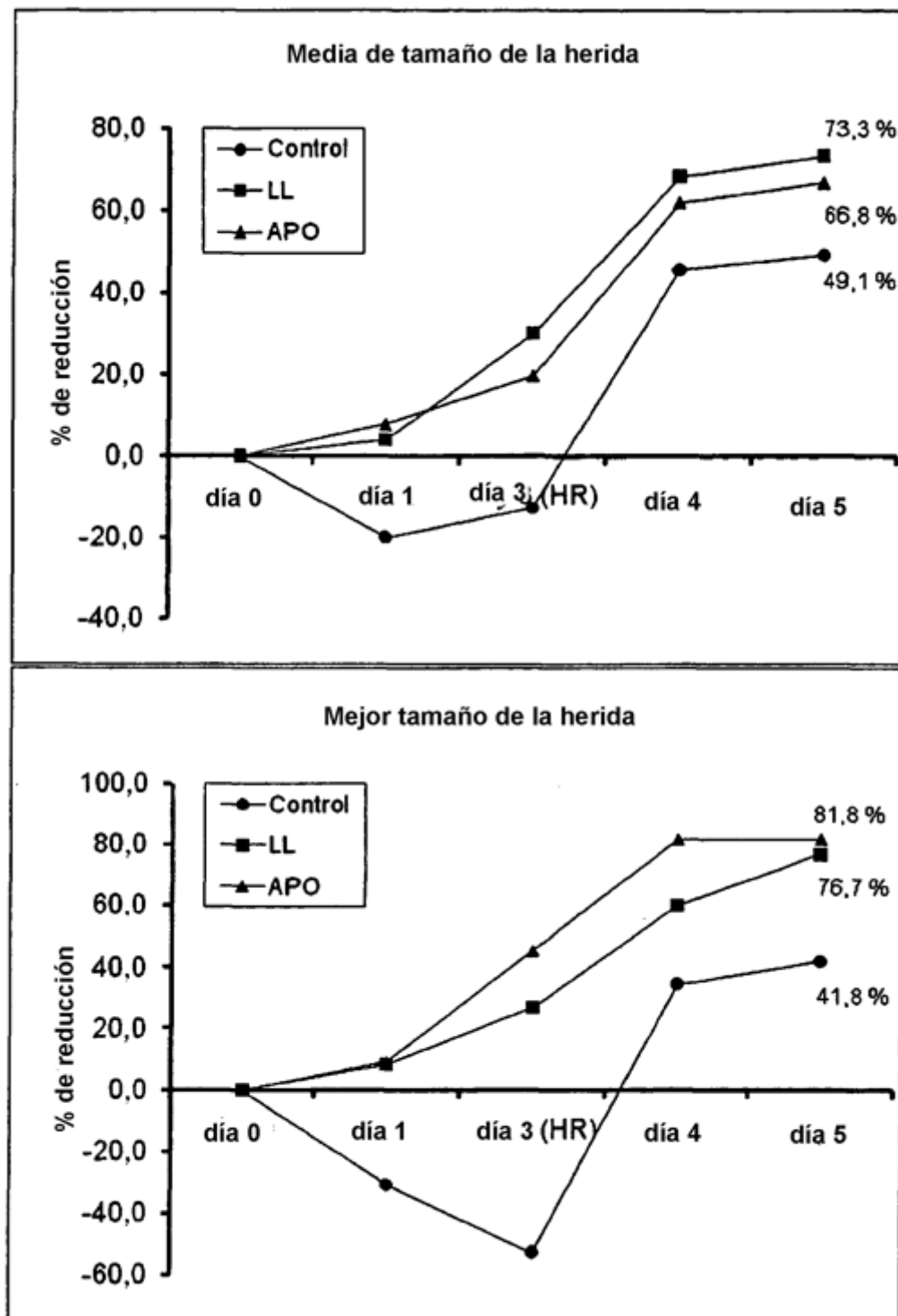


Fig. 4

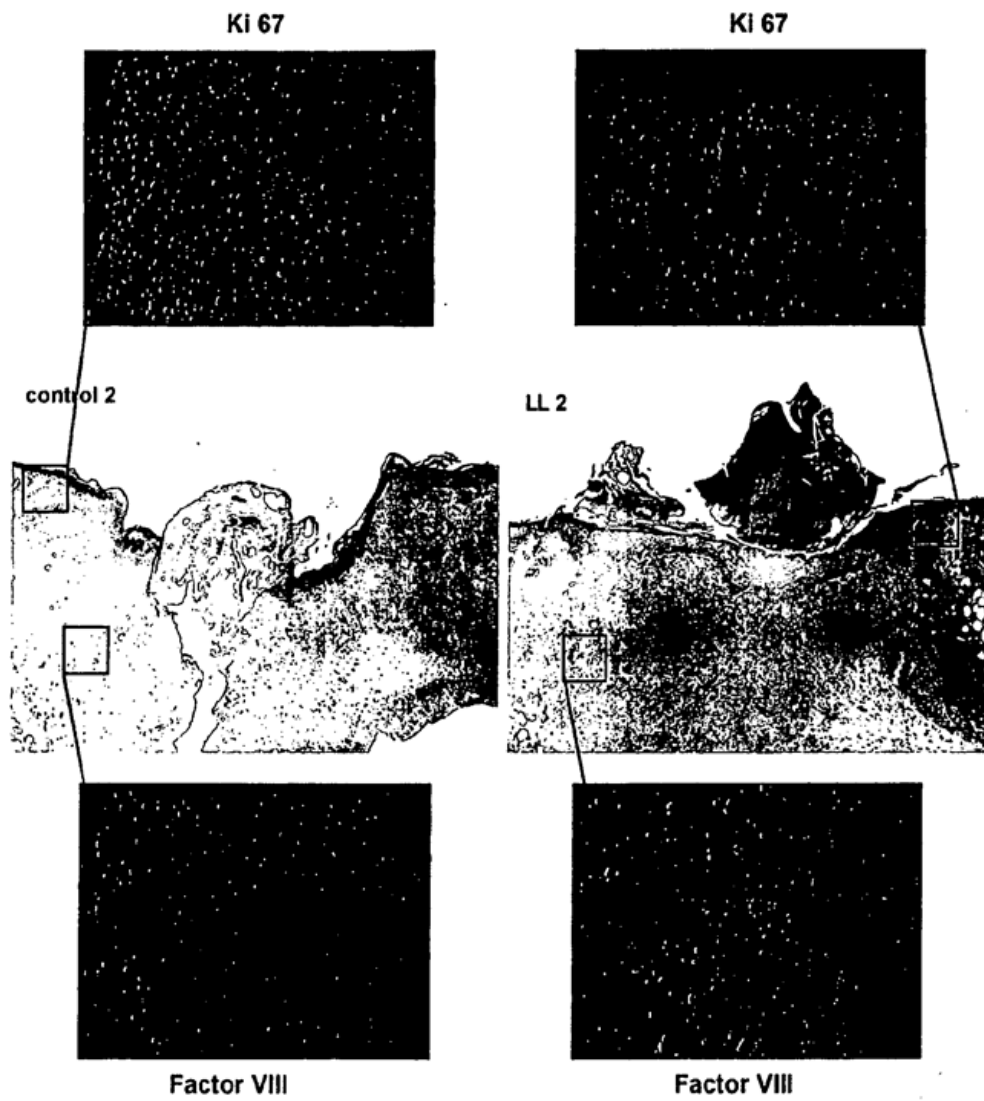


Fig. 5a

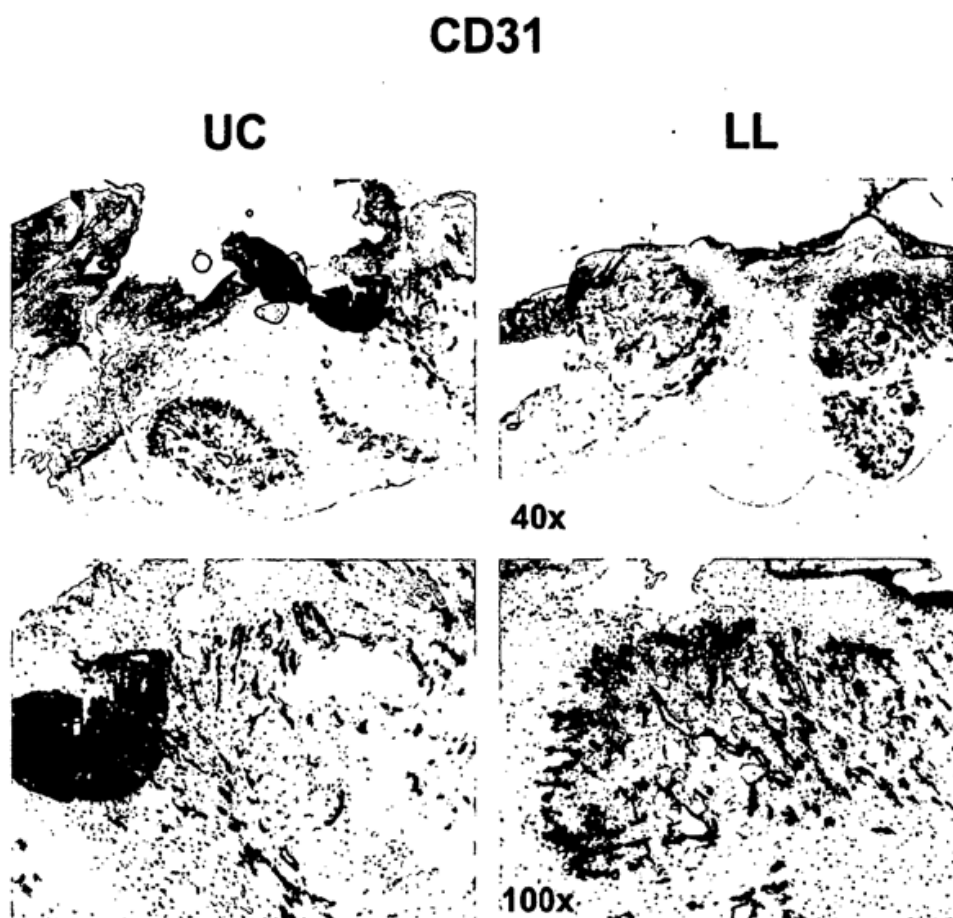


Fig. 5b

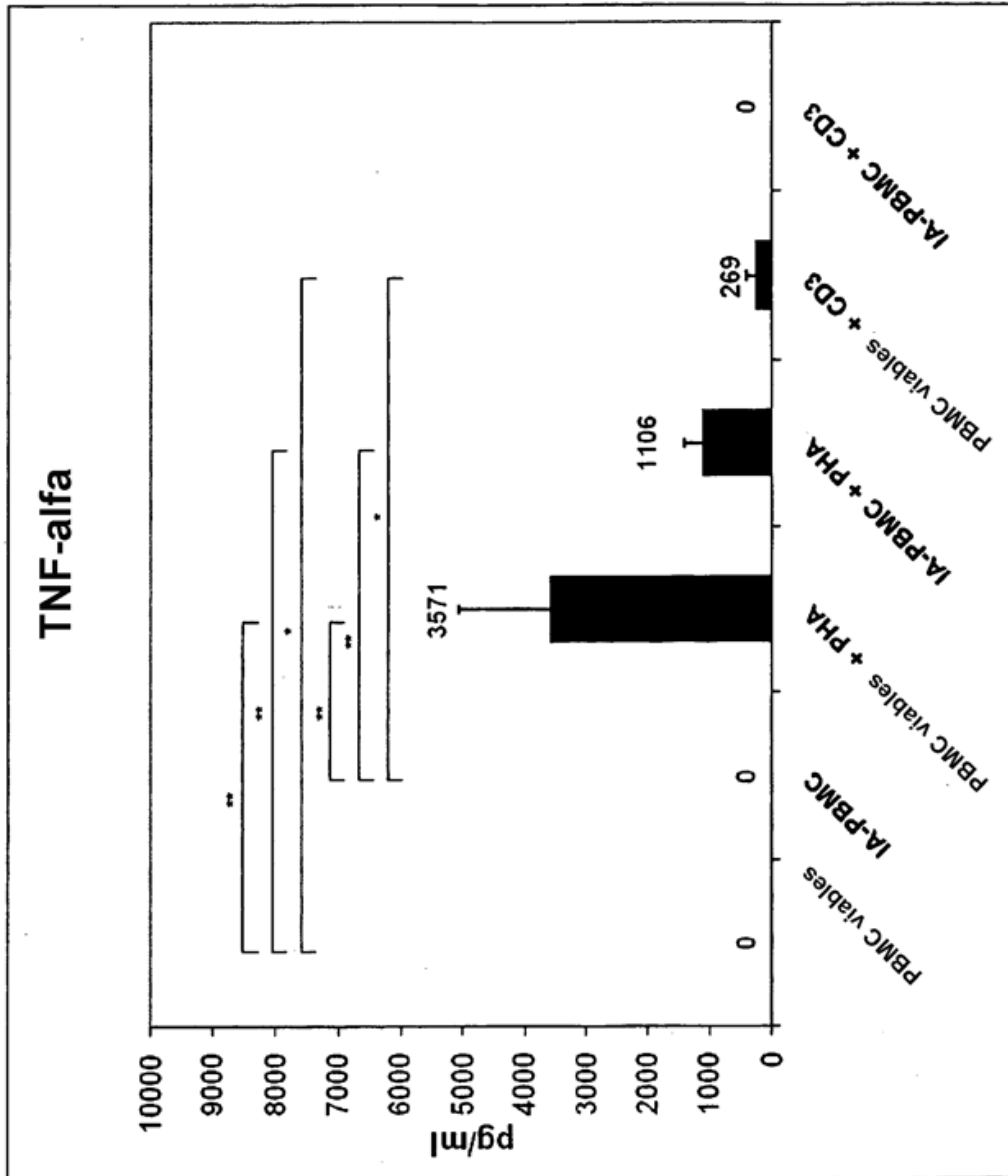


Fig. 6a

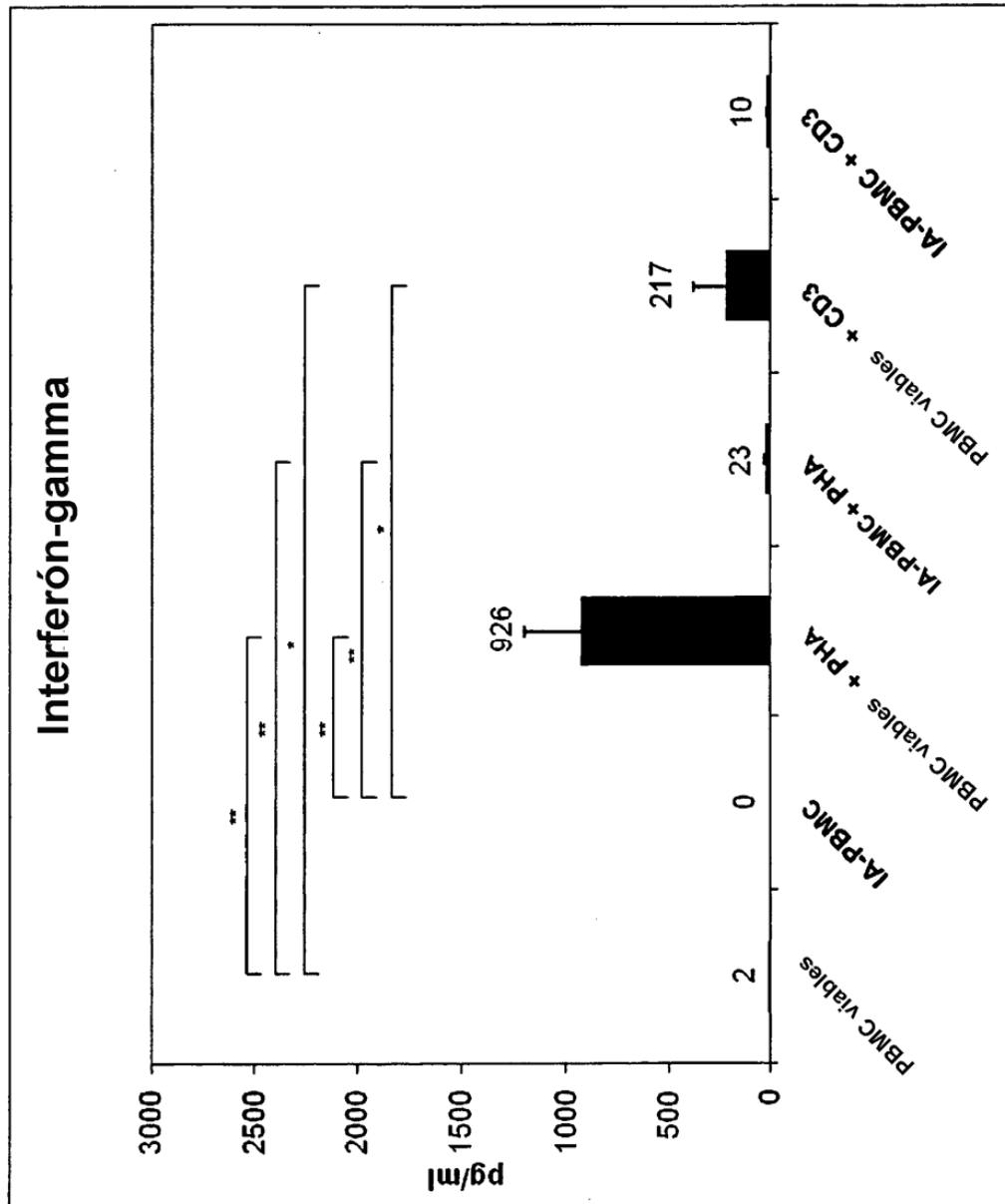


Fig. 6b

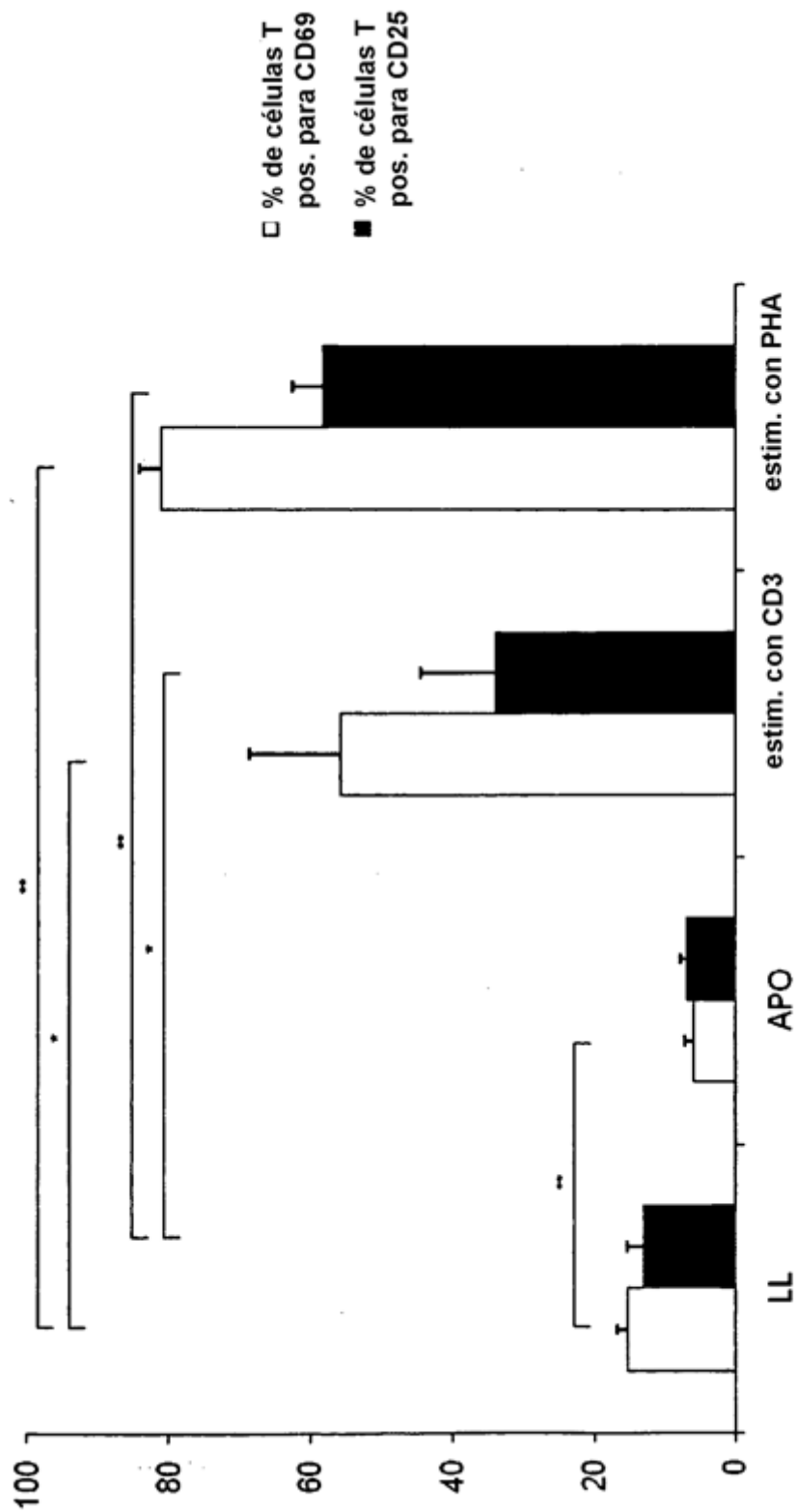


Fig. 7a

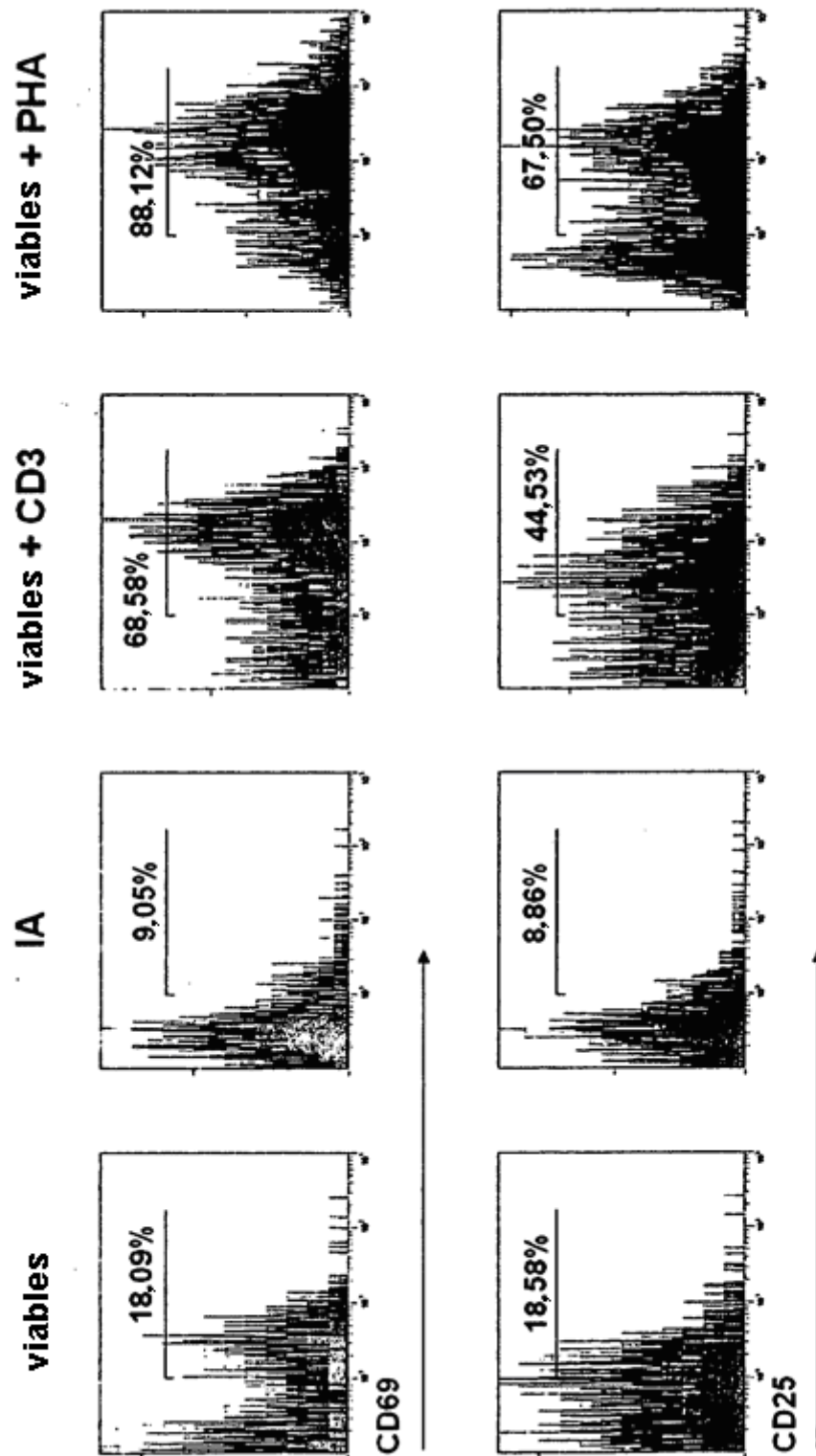


Fig. 7b

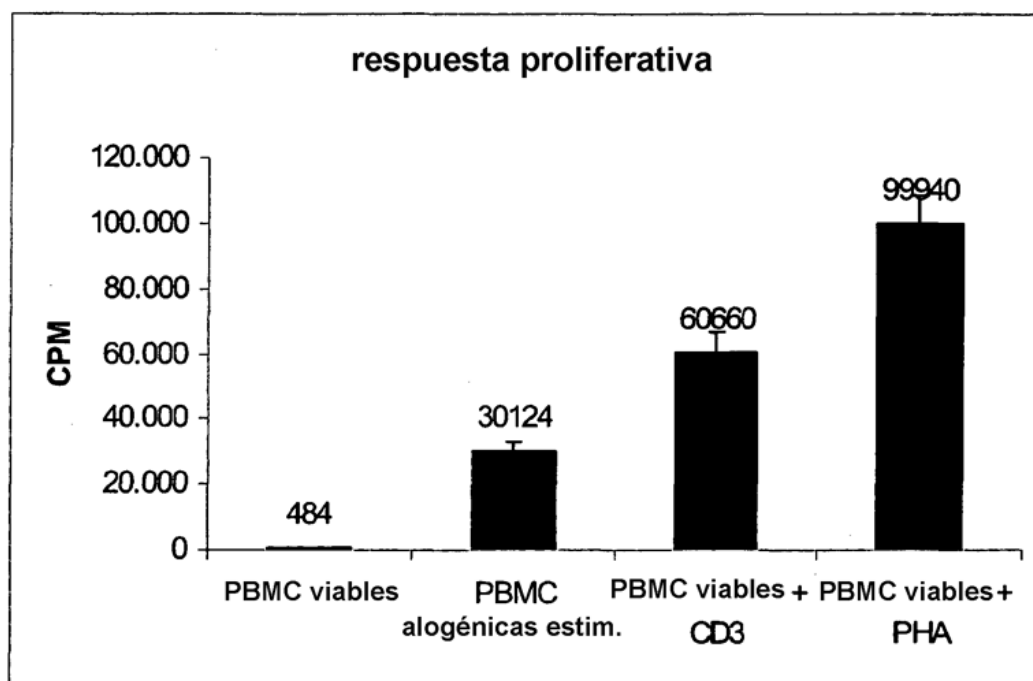


Fig. 8

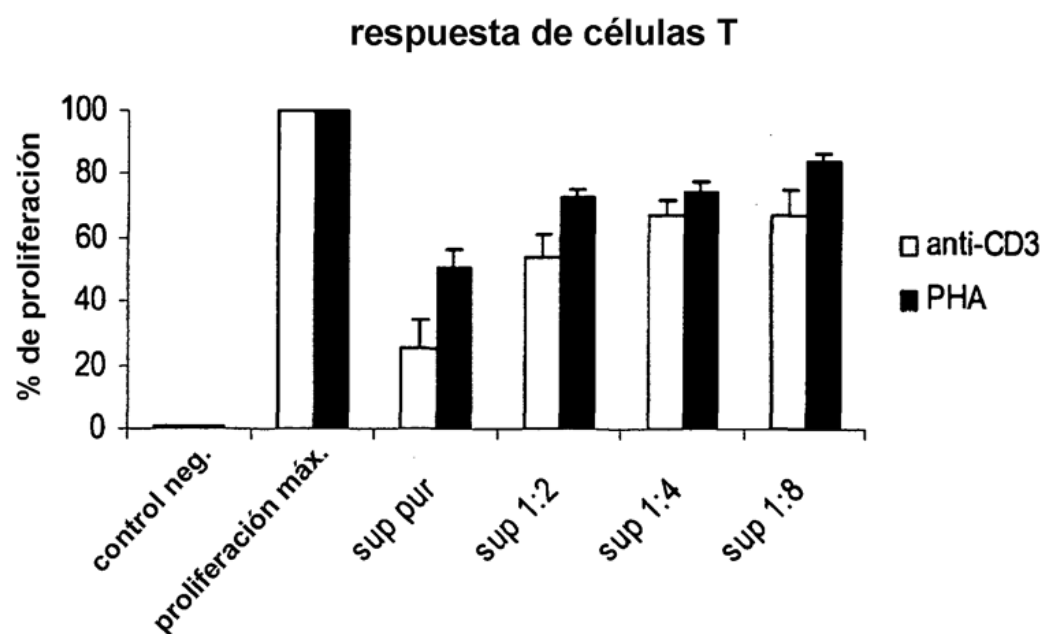


Fig. 9

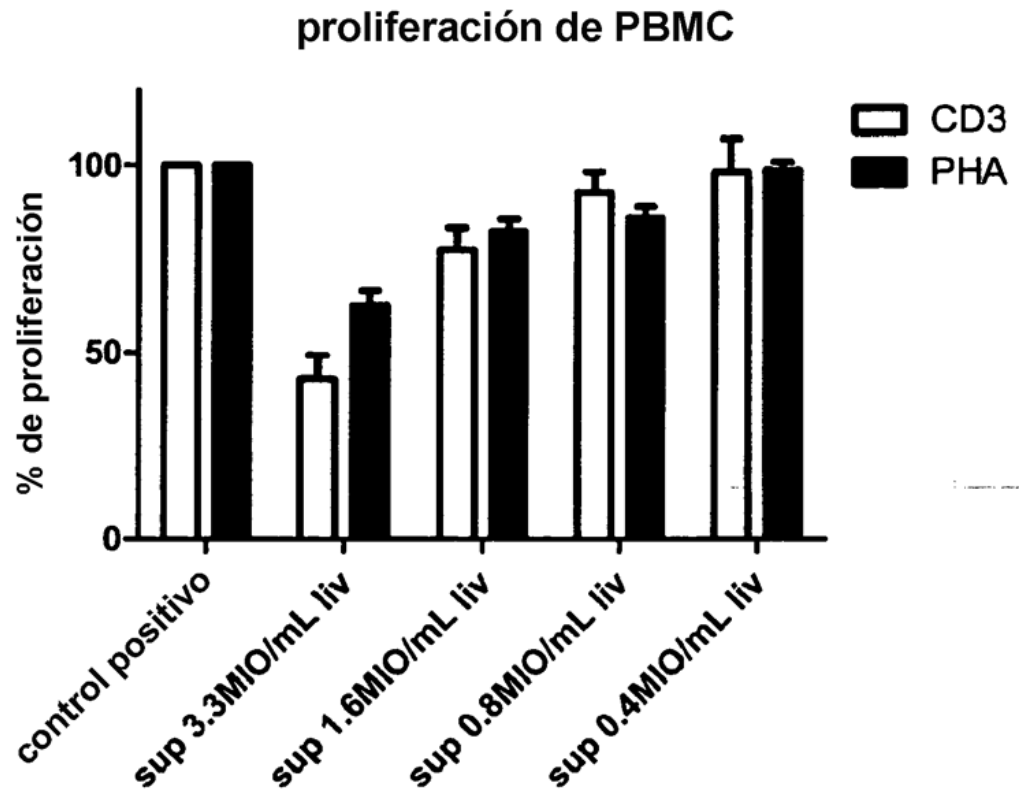
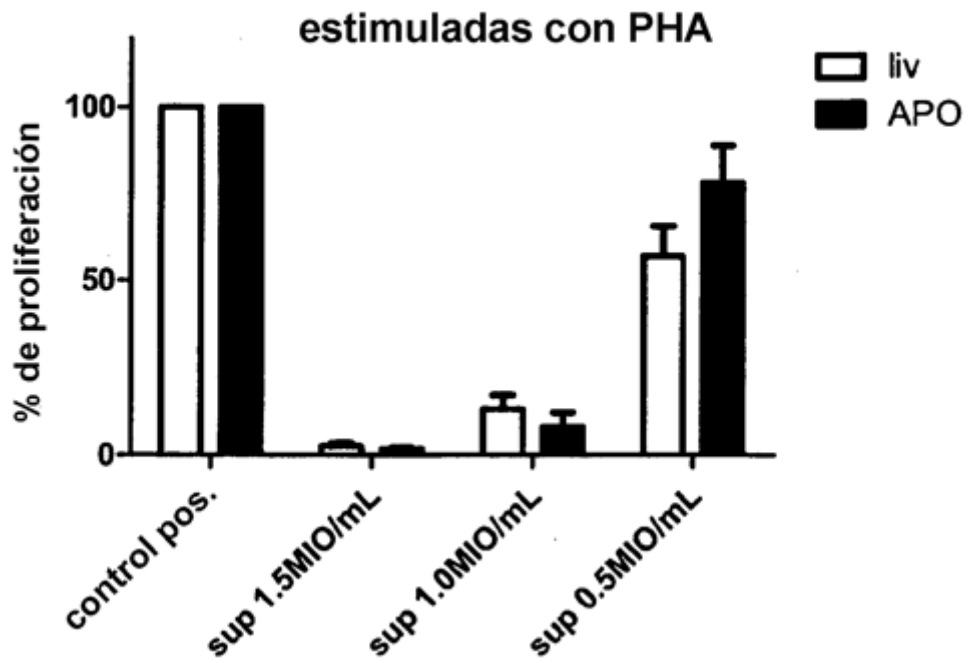
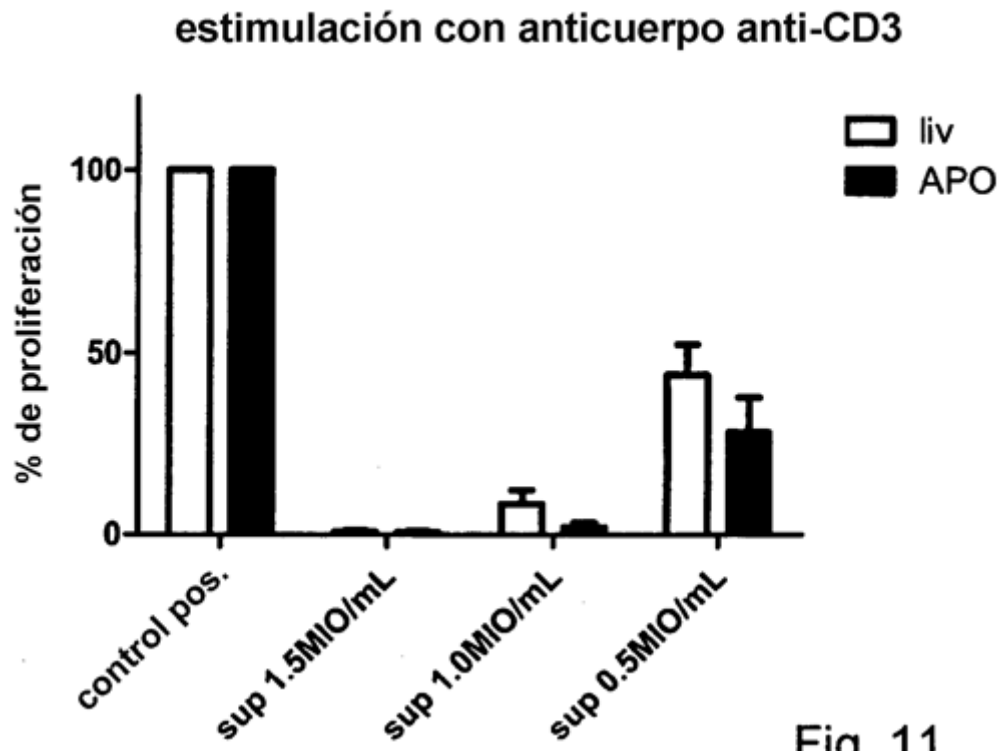


Fig. 10



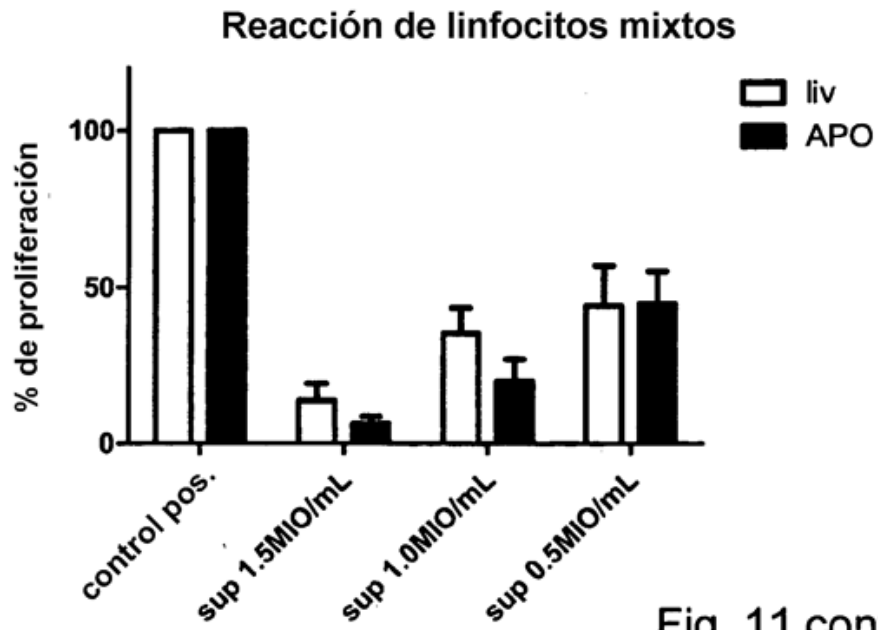
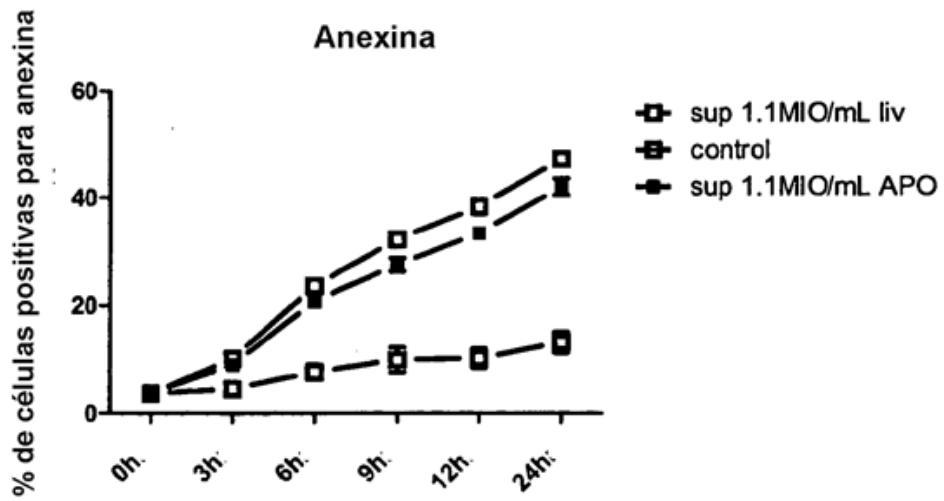


Fig. 11 cont.

Fig. 12



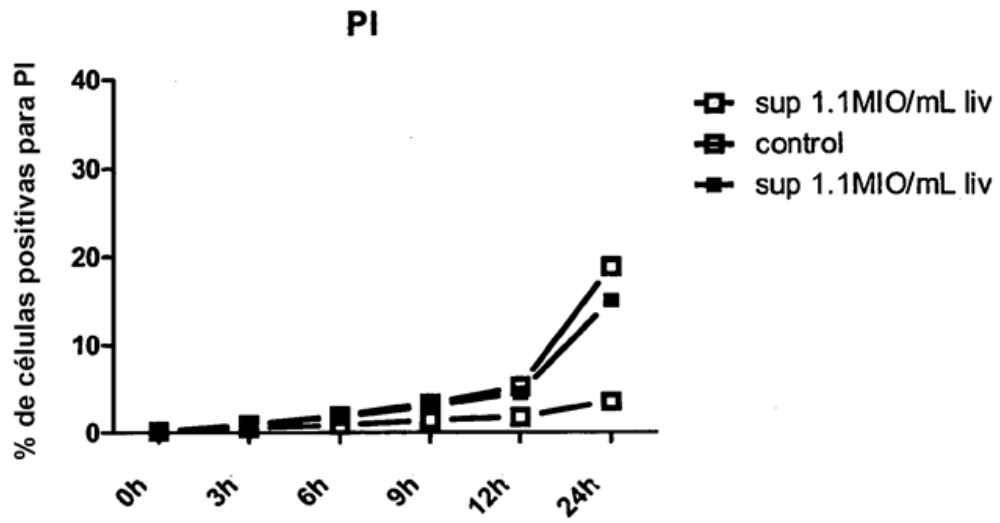
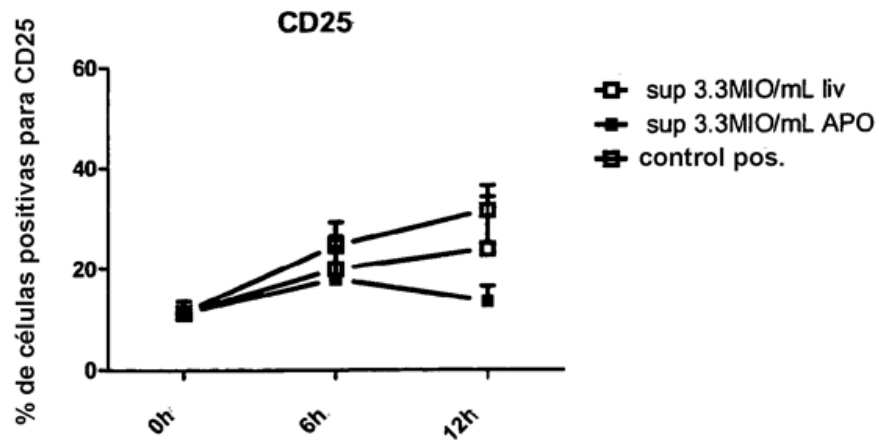


Fig. 12 cont.

Fig. 13



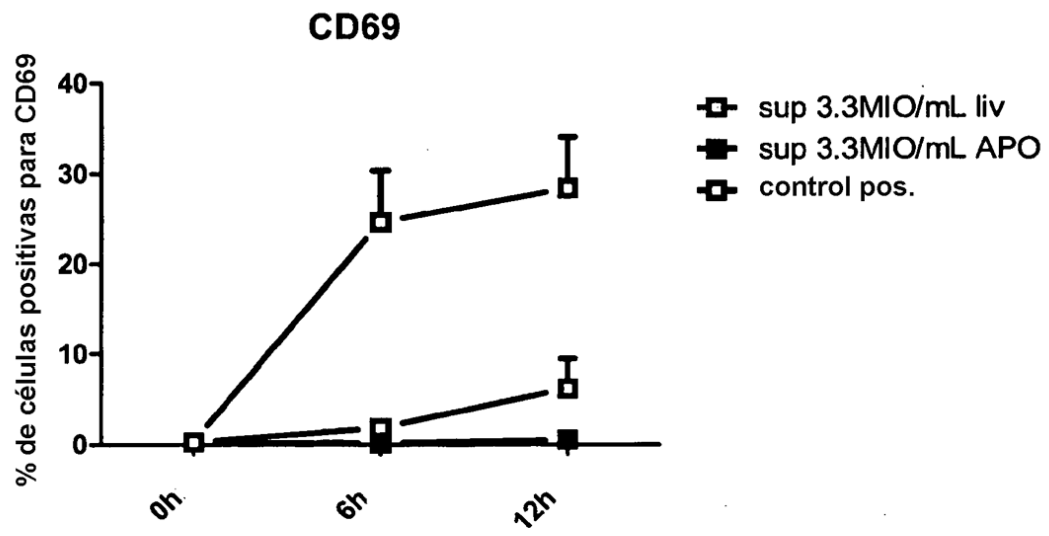


Fig. 13 cont.

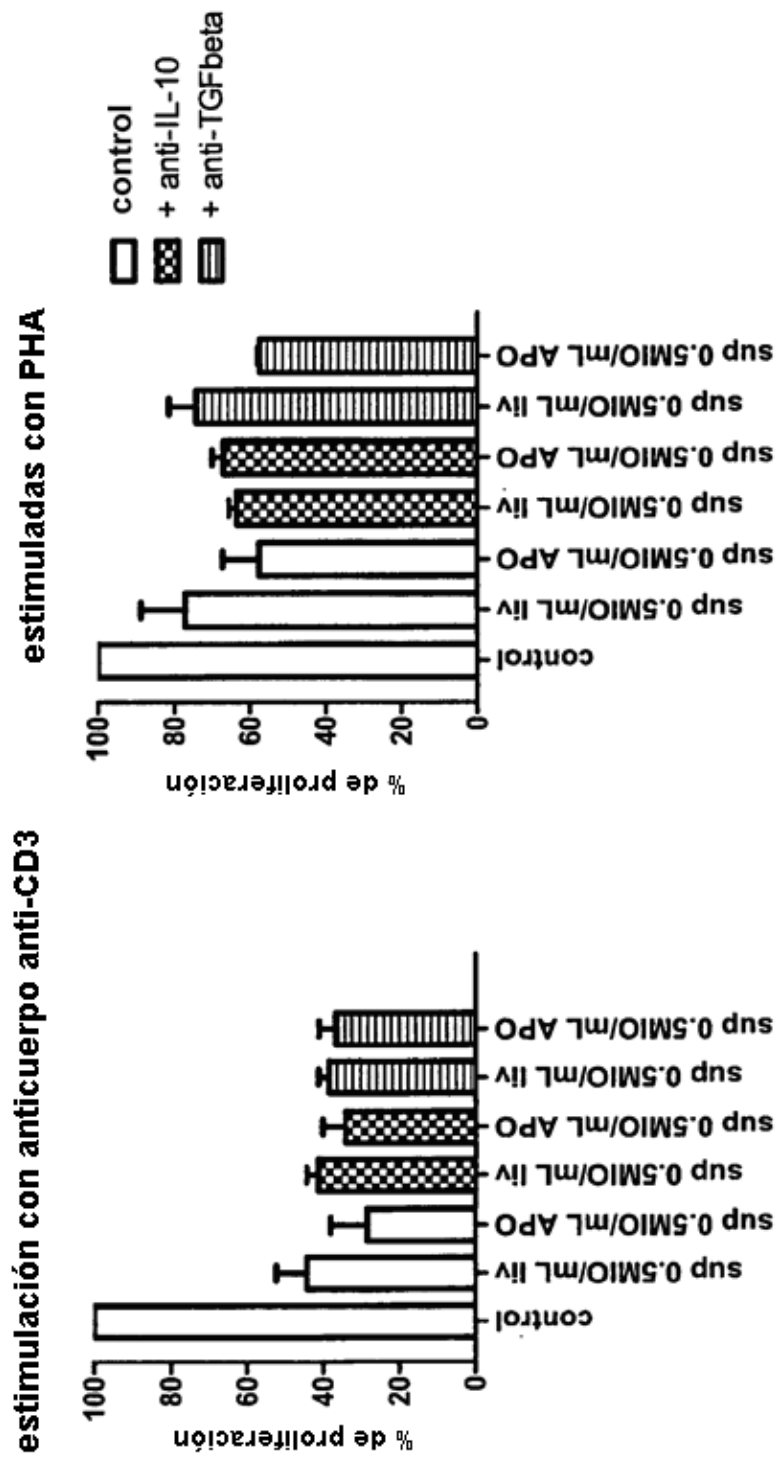


Fig. 14