



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112015031772-3 B1



(22) Data do Depósito: 18/06/2014

(45) Data de Concessão: 08/09/2021

(54) Título: USO DE CÉLULAS DA BAINHA DÉRMICA NÃO BULBAR (NBDS) ISOLADAS PARA A FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA TRATAR OU PREVENIR O ENVELHECIMENTO DA PELE OU LESÃO DA PELE

(51) Int.Cl.: A61K 35/36; C12N 5/071; A61P 17/00.

(30) Prioridade Unionista: 18/06/2013 US 61/836,634.

(73) Titular(es): REPLICEL LIFE SCIENCES INC..

(72) Inventor(es): ROLF HOFFMANN; KEVIN JOHN MCELWEE.

(86) Pedido PCT: PCT US2014043048 de 18/06/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/205142 de 24/12/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 17/12/2015

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DA PELE A presente invenção se refere às composições e aos métodos que utilizam células da bainha dérmica não bulbar derivadas de folículo piloso para o uso no tratamento de pele.

“USO DE CÉLULAS DA BAINHA DÉRMICA NÃO BULBAR (NBDS) ISOLADAS PARA A FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA TRATAR OU PREVENIR O ENVELHECIMENTO DA PELE OU LESÃO DA PELE”

REFERÊNCIA CRUZADA AO PEDIDO RELACIONADO

[001]Este pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C. § 119(e) do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 61/836.634 depositado em 18 de Junho de 2013, o qual é integralmente incorporado neste relatório como referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002]A presente invenção se refere às composições e aos métodos para o tratamento da pele para vários propósitos cosméticos e estéticos e, mais especificamente, às composições compreendendo células de bainha dérmica não bulbar (NBDS) autólogas ou alogênicas para o uso no tratamento e reparo da pele, incluindo, por exemplo, lesões da pele, e para a prevenção de envelhecimento da pele, assim como para vários propósitos cosméticos e estéticos.

FUNDAMENTOS

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA

[003]A pele é um órgão complexo e pode ser dividida em pelo menos três camadas distintas, a epiderme, a derme e a hipoderme. A maioria do tecido conjuntivo fibroso dentro da pele é formada por fibroblastos dérmicos, que secretam tipos diferentes de colágenos (tais como tipo 1, 3 e outros) para fornecer firmeza à pele, para manter a epiderme e, além disso, para secretar vários fatores autócrinos e parácrinos.

[004]A pele pode atuar ou ser lesionada em diversas formas, incluindo, por exemplo, através de trauma externo (incluindo procedimentos cirúrgicos), acne e outras reações inflamatórias que levam a cicatrizes, doenças inerentes que levam à pele frágil, tal como epidermólise bolhosa distrófica com ferimentos crônicos, doença inflamatória autoimune crônica, tal como esclerodermia e variantes, infecção por bor-

relíose, lúpus eritematoso e variantes, líquen plano, o efeito negativo do fumo e luz UV (envelhecimento extrínseco) e envelhecimento geral (envelhecimento intrínseco).

[005]O envelhecimento da pele é multifatorial e além dos mecanismos intrínsecos/genéticos, o fumo e luz UV apresentam efeitos deletérios sobre a pele. Durante o curso de muitos anos, o colágeno dérmico é degradado e com isso os contatos (por exemplo, integrinas) de colágenos ao fibroblasto são diminuídos. Como uma consequência, fibroblastos envelhecidos mostram uma forma arredondada ao contrário dos fibroblastos jovens na forma de eixo multiconectados. Com o passar do tempo, isto leva à frouxidão pele clinicamente visível como rugas finas ou, algumas vezes, mais pronunciadas na face, nas mãos, nas partes inferiores dos braços, no colo e em outras partes.

[006] Embora existam alguns métodos cirúrgicos e não cirúrgicos que possam ser usados para o tratamento da pele, mas nenhuma de tais técnicas aborda o problema de um déficit celular de fibroblastos funcionais na pele envelhecida.

[007] A presente invenção divulga novas composições e métodos para o tratamento de envelhecimento e lesões da pele e ainda fornece outras vantagens relacionadas.

SUMÁRIO

[008]Brevemente estabelecida, a presente invenção fornece composições e métodos para tratar ou prevenir envelhecimento da pele ou lesões da pele utilizando células de Bainha Dérmica Não Bulbar (“NBDS”) derivadas de folículo piloso. Em um aspecto da presente invenção, os métodos são fornecidos compreendendo as etapas de (a) preparar cabelo vital (isto é, “vivo”); e (b) cultivar o cabelo vital, tal que uma população de células de NBDS possa ser obtida. Nas formas de realização preferidas, as células de NBDS são isoladas.

[009]Em um aspecto da invenção, os métodos são fornecidos para isolar as células de NBDS, compreendendo as etapas de: (a) preparar cabelo vital; (b) clivar o

cabelo preparado na etapa (a) para remover o bulbo do folículo piloso (que contém o copo da bainha dérmica e papila dérmica); (c) isolar o tecido da Bainha Dérmica Não Bulbar; e (d) cultivar o tecido da bainha dérmica não bulbar isolado para produzir células de NBDS. Em uma forma de realização da invenção, o cabelo vital é obtido através de biópsia a partir do couro cabeludo occipital de um sujeito. Em uma outra forma de realização, o cabelo é clivado utilizando um micromanipulador e bisturi. Ainda em outras formas de realização, os métodos fornecidos neste relatório ainda compreendem a etapa de conduzir digestão enzimática do tecido de Bainha Dérmica Não Bulbar isolado, opcionalmente, por exemplo, com enzimas de digestão de colágeno, tais como colagenase, dispase e leupeptina. Em formas de realização adicionais, as células são passadas em múltiplas passagens.

[010]Em outros aspectos da invenção, células de NBDS isoladas são fornecidas, opcionalmente, preparadas de acordo com os métodos descritos acima, em que as células são isoladas, de modo a fornecer uma população que é principalmente positiva para um ou mais entre: CD 90, CD73 e CD49b e/ou, principalmente, negativa para um ou mais entre CD34, CD45 e KRT14 (opcionalmente, antes ou depois da cultura). Nas formas de realização preferidas, as células de NBDS isoladas são pelo menos 70%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 100% positivas para um ou mais entre os marcadores positivos descritos acima e/ou pelo menos 80%, 90%, 95%, ou 98% negativas para um entre os marcadores negativos descritos acima.

[011]Nas formas de realização preferidas da invenção, as células de NBDS isoladas apresentam menos do que 15%, 10%, 5% ou 1% de queratinócitos na população celular e/ou menos do que 15%, 10%, 5% ou 1% de melanócitos na população celular. Entretanto, nas formas de realização adicionais, a população celular de NBDS isolada é derivada de uma população de células dérmicas (preferivelmente, a partir de um folículo piloso) que apresentam alguns tipos celulares contaminantes, incluindo, por exemplo, pelo menos 1, 5, 10, 0,01%, 0,1%, ou 1% de queratinócitos

na população celular e/ou pelo menos 5, 10, 0,1%, 0,01% de melanócitos. Nas formas de realização adicionais da invenção, as células de NBDS isoladas são pelo menos 95% puras e apresentam pelo menos um tipo celular contaminante (por exemplo, pelo menos um queratinócito) na população celular.

[012]Estas células de NBDS (ou células de NBDS expandidas ou isoladas) podem estar contidas nas composições com outros ingredientes, tais como, por exemplo, plasma do soro, fibrina e/ou ácido hialurônico. Em outras formas de realização, as células de NBDS (ou células de NBDS expandidas ou isoladas) podem ser constituídas em uma composição adequada para injeção, por exemplo, solução de Ringer Lactada ou uma solução salina tamponada. Outros ingredientes que podem ser utilizados para formar as composições da presente invenção incluem, por exemplo, componentes da matriz extracelular (por exemplo, glicosaminoglicanos (GAGs), sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, ácido hialurônico, albumina (por exemplo, albumina humana), elastina, fibronectinas e lamininas), citocinas e quimiocinas (por exemplo, fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta) e suas isoformas, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e suas isoformas, fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), proteína relacionada ao hormônio da paratireoide, fator de crescimento de hepatócitos/fator de dispersão (HGF/SF), proteína estimulante de macrófagos (MSP), fator de crescimento epidérmico (EGF), interleucina 6 (IL-6), fator derivado de células estromais 1 (SDF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e/ou vários agentes terapêuticos (por exemplo, agentes analgésicos, agentes anti-inflamatórios e agentes imunomoduladores). Em outras formas de realização, entretanto, as células de NBDS (e células de NBDS isoladas) são fornecidas em composições que não apresentam qualquer um entre os ingredientes anteriormente mencionados (incluindo, por exemplo, soro ou plasma).

[013]Ainda em outros aspectos da invenção, os métodos são fornecidos para

tratar a pele de um sujeito, compreendendo a etapa de administrar à pele de um sujeito uma composição compreendendo as células de NBDS, conforme descrito neste relatório. Em uma forma de realização, o sujeito é um mamífero selecionado a partir do grupo que consiste de seres humanos, cavalo, cães e gatos. Em várias formas de realização, o tratamento ocorre devido a uma lesão na pele. Em certas formas de realização, a lesão na pele pode resultar de trauma externo (por exemplo, um procedimento cirúrgico ou ferimento, queimadura, radiação ou um acidente) ou um ferimento ou cicatriz agudo ou crônico. Em outras formas de realização, a lesão na pele é uma predisposição de contusões espontâneas ou induzidas nas extremidades. Ainda em outras formas de realização, a lesão na pele ocorre devido à acne e/ou outras reações inflamatórias que levam às cicatrizes, doença inerente com pele frágil, tal como epidermólise bolhosa distrófica ou outras doenças bolhosas inerentes ou adquiridas com ferimentos crônicos incorridos por diabetes mellitus, arteriosclerose ou varizes, infecções virais, micóticas ou bacterianas agudas ou crônicas, doença inflamatória autoimune crônica, tal como esclerodermia e variantes, Infecção por borreliose, lúpus eritematoso e variantes, líquen plano, o efeito negativo do fumo e luz UV (envelhecimento extrínseco) e envelhecimento geral (envelhecimento intrínseco). Ainda em uma outra forma de realização, a pele está no corpo humano total ou uma parte selecionada do corpo (tal como as mãos, face e pescoço. Em outras formas de realização, a pele pode ser envelhecida/danificada pelo sol (luz UV) ou fumo. Nas formas de realização relacionadas, a pele envelhecida sofre de condições selecionadas a partir do grupo que consiste de rugas finas ou grossas, espessura da pele diminuída, elasticidade e firmeza diminuídas. Em outras formas de realização, a pele é tratada para propósitos cosméticos (por exemplo, para reduzir a aparência de celulite). Ainda em outras formas de realização, não existe lesão ou trauma visível presente à pele, mas a pele, não obstante, pode ser tratada, de modo a prevenir ou atrasar a incidência de envelhecimento normal, ou para melhorar a aparência (e tex-

tura) da pele normal.

[014]Em um outro aspecto da invenção, as composições são fornecidas compreendendo sobrenadantes de cultura celular de NBDS. Em uma forma de realização, o sobrenadante de cultura celular de NBDS é preparado a partir de células de NBDS cultivadas, conforme descrito neste relatório. Em outra forma de realização, o sobrenadante de cultura celular de NBDS pode ser armazenado através de congelamento, liofilização ou outros métodos adequados. O sobrenadante de cultura celular de NBDS pode ser utilizado em uma variedade de métodos, incluindo, por exemplo, topicamente aplicado, injetado (por exemplo, pequenas injeções à pele ou outras partes do corpo).

[015]Em várias formas de realização, o sobrenadante de cultura celular de NBDS pode ser preparado e utilizado (por exemplo, depois da filtração), diluído com tampões ou excipientes adequados, concentrado ou com vários componentes separados (que podem ser separadamente utilizados (por exemplo, fator de células tronco, fatores de wnt, outro fator de crescimento, citocinas ou quimiocinas). Em uma forma de realização, o sobrenadante de cultura celular de NBDS é utilizado, diluído ou concentrado, e combinado ou misturado com um composto ou composições adequados para administração (por exemplo, um gel, creme ou composição com base em polímero). Exemplos representativos incluem ácido hialurônico, colágeno, matriz extracelular, suportes, composições com base em polímero (por exemplo, polietilenoglicóis, ácidos polilácticos e policaprolactonas), Outros portadores adequados para os sobrenadantes de cultura celular de NBDS incluem pastas e outros líquidos utilizados na indústria cosmética (por exemplo, emulsões, lacas, tônicos, xampus, pulverizações). Em outras formas de realização, os sobrenadantes de cultura celular de NBDS podem ser colocados em matrizes extracelulares fabricadas ou coletadas (veja, por exemplo, o US 20100047305 ou US 20100124573). Em outras formas de realização, as células podem ser utilizadas em um dispositivo médico ou colocadas

sobre ou dentro de um suporte não biodegradável ou biodegradável ou outra estrutura. Suportes ou estruturas particularmente preferidos incluem suportes biodegradáveis (por exemplo, suportes com base em colágeno, tais como, por exemplo, malhas). Exemplos representativos de suportes adequados incluem, por exemplo, Patentes U.S. N^{os} 5.736.372, 5.759.830, 8.039.258 e 8.105.380, as quais são integralmente incorporadas como referência.

[016] Os detalhes de uma ou mais formas de realização são apresentados na descrição abaixo. Outras características, objetivos e vantagens serão evidentes a partir da descrição, desenhos e reivindicações. Além disso, as divulgações de todas as patentes e pedidos de patente referenciados neste relatório são integralmente incorporadas como referência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[017] A Figura 1 ilustra a dissecação de um folículo piloso humano. A Figura 1A mostra um folículo piloso humano isolado, que pode ser clivado acima da parte bulbar da raiz do cabelo (isto é, acima das células da papila dérmica e copo da bainha dérmica, isto é, acima dos bulbos terminais), mas abaixo da base do canal da glândula sebácea, de modo a obter uma bainha dérmica isolada (veja a Figura 1B). A estrutura representada na Figura 1B pode ser separada em pelo menos dois componentes separados, conforme mostrado nas Figuras 1C e 1D. A Figura 1C representa a fibra do cabelo e bainha da raiz interna associada, e bainha da raiz externa que contém predominantemente queratinócitos, e a Figura 1D é a bainha dérmica contendo células de NBDS (também ocasionalmente referidas como a bainha do tecido conjuntivo, bainha dérmica superior ou, menos precisamente, apenas a bainha dérmica). Ao contrário das células do copo da bainha dérmica (DSC) e células da papila dérmica (DP), as células de NBDS são altamente positivas para um marcador de colágeno-1 e apenas fracamente para fosfatase alcalina e esteroide sulfatase. Além disso, estas células expressam marcadores, tais como CD90 e outros

marcadores de células tronco.

[018]A Figura 2 é uma ilustração de um folículo piloso que representa a origem para as células da papila dérmica (“DP”), células do copo da bainha dérmica (“DSC”) e células da bainha dérmica não bulbar (“NBDS”).

[019]A Figura 3 é um fotomicrografia de células de NBDS em cultura.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[020]Conforme observado acima, a presente invenção fornece células de bainha dérmica não bulbar derivadas de folículo piloso (NBDS) para o uso no tratamento ou prevenção de envelhecimento da pele e lesões da pele em um mamífero. Antes de apresentar a invenção, entretanto, pode ser útil para um entendimento da mesma primeiro apresentar as definições de certos termos que são usados em seguida.

[021]Células da bainha dérmica não bulbar ou células “NBDS” se referem às células dermicamente derivadas (ou, mais especificamente, derivadas de folículos pilosos). Nas formas de realização preferidas, as células da bainha são obtidas a partir da bainha dérmica externa de um folículo piloso, acima da parte bulbar da raiz do cabelo (isto é, acima das células da papila dérmica e copo da bainha dérmica), mas abaixo da base do canal da glândula sebácea. Em formas de realização particularmente preferidas da invenção, as células de NBDS são células naïve (natural) a UV, isto é, não foram expostas à exposição UV real (por exemplo, em comparação ao nariz ou à parte superior das mãos). As células de NBDS podem ser expandida e isoladas, conforme descrito em mais detalhes abaixo.

[022]As células de NBDS podem ser facilmente identificadas por alguns métodos, incluindo, por exemplo, através do método de preparação e cultura (conforme descrito abaixo); morfologia (veja, por exemplo, a Figura 3); assim como marcadores específicos de células (por exemplo, as células de NBDS são, principalmente, positivas para CD90, CD73 e CD49b e/ou, principalmente, negativas para CD34, CD45 e

KRT14, antes ou depois da cultura). Em todos os eventos, entretanto, as células devem ser de uma origem dérmica, ou, em formas de realização mais preferidas, a partir de um folículo piloso.

[023]Células da bainha dérmica não bulbar expandidas, ou “células de eNBDS” se referem às células de NBDS que foram expandidas durante várias passagens na cultura, mas que conservam a capacidade de produzir colágeno (por exemplo, colágeno tipo I), assim como uma variedade de citocinas, quimiocinas e hormônios. Conforme apresentado acima, inesperadamente, as células de eNBDS também podem ser imunorregulatórias. Nas formas de realização preferidas, as células podem ser expandidas na cultura durante 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 ou mais passagens.

[024]Células de NBDS “isoladas” se referem a uma população celular de mais do que 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 100% de células de NBDS. As células de NBDS apresentam a capacidade de produzir colágeno (por exemplo, colágeno tipo I), assim como uma variedade de citocinas e quimiocinas. Inesperadamente, as células de NBDS também podem ser imunorregulatórias, tornando as mesmas particularmente adequadas para o tratamento de lesões da pele (por exemplo, através do auxílio na supressão de qualquer resposta inflamatória).

[025]Em certas formas de realização da invenção, software ou outras técnicas de visualização que podem ser utilizadas para visualizar as células em uma escala microscópica podem ser usados para avaliar o tamanho, forma, viabilidade e granularidade de um grande número de células em um campo visual e verificar o número de células de NBDS (que são do tipo fibroblasto - conforme mostrado na Figura 3), ao contrário de queratinócitos, melanócitos DSCs e outros tipos celulares que são de morfologia diferente). Consequentemente, em uma forma de realização da invenção, os métodos são fornecidos para isolar as células de NBDS compreendendo a etapa de cultivar as células durante pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, ou 20 passagens a partir de um folículo piloso, tal que uma população isolada de células

de NBDS é produzida. Nas formas de realização preferidas, as células colocadas em placas ou frascos que permitem que as células de NBDS sejam aderidas, e com cada passagem, as células não aderentes são removidas, e as células aderentes remanescentes liberadas (por exemplo, através de tripsinização), seguido por adição de meio fresco. Em tais formas de realização, pode ser determinado quando uma população suficiente de células de NBDS isoladas foi obtida através da visualização das células na cultura celular, de modo a avaliar o número de células de NBDS vs. células não NBDS. As técnicas de visualização incluem, mas não são limitadas para direcionar a visualização microscópica, pigmentação das células para os marcadores (ou falta dos mesmos - por exemplo, para falta de queratina), e análise de luz/laser para a visualização nos padrões de difração dos tipos celulares diferentes (veja, em geral, "Laser Scanning Microscopy and Quantitative Image Analysis of Neuronal Tissue" Lidia Bakota e Roland Brandt, eds., Humana Press, 2014; veja também "Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells: Optical and Spectroscopic Techniques", Conn ed., Academic Press, 2012).

[026]Em outras formas de realização, marcadores específicos de células (por exemplo, células de NBDS são, principalmente, positivas para CD90, CD73 e CD49b e/ou, principalmente, negativas para CD34, CD45 e KRT14 (opcionalmente antes ou depois de cultura) podem ser utilizados para avaliar o grau de células de NBDS vs. tipos celulares contaminantes. "Applications of Flow Cytometry in Stem Cell Research and Tissue Regeneration", Krishan, Krishnamurthy, e Totey eds., Wiley-Blackwell, 2010). Por exemplo, as células de NBDS isoladas podem ser preparadas através de a) obtenção de um ou mais folículos pilosos vitais; b) liberação das células a partir do folículo piloso (por exemplo, através do uso de enzimas, ou através da cultura de células em crescimento fora do folículo piloso); e c) classificação das células (por exemplo, através de citometria de fluxo ou através do uso de pérolas magnéticas) para obter uma população de células de NBDS isoladas. Em certas

formas de realização da invenção, as células em qualquer estágio do processo podem ser opcionalmente cultivadas, conforme descrito acima (por exemplo, as células podem ser cultivadas durante pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10 ou 20 passagens, conforme descrito acima, e as células resultantes ainda isoladas, por exemplo, através de citometria de fluxo ou pérolas magnéticas.

[027] Nas formas de realização preferidas, as células de NBDS isoladas são pelo menos 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 100% positivas para um ou mais entre os marcadores positivos descritos acima e/ou pelo menos 80%, 90%, 95%, ou 98% negativas para um entre os marcadores negativos descritos acima.

[028] Nas formas de realização adicionais preferidas da invenção, as células de NBDS são isoladas a partir de tecido natural à ultravioleta e, em particular, a partir de folículos que são cobertos pelo cabelo e, conseqüentemente, apresentam menos exposição à ultravioleta e/ou lesão do que, por exemplo, células dérmicas sobre mãos ou antebraço.

[029] Nas formas de realização preferidas da invenção (e utilizando qualquer uma das técnicas descritas neste relatório), células de NBDS isoladas apresentam menos do que 15%, 10%, 5% ou 1% de queratinócitos na população celular e/ou menos do que 15%, 10%, 5% ou 1% de melanócitos na população celular. Entretanto, nas formas de realização adicionais, a população celular de NBDS isolada é derivada de uma população de células dérmicas (preferivelmente, a partir de folículo pilosos) que apresentam alguns tipos celulares contaminantes, incluindo, por exemplo, pelo menos 1, 5, 10, 0,01%, 0,1%, ou 1% de queratinócitos na população celular e/ou pelo menos 5, 10, 0,1%, 0,01% de melanócitos. Nas formas de realização adicionais da invenção, as células de NBDS isoladas são pelo menos 95% puras e apresentam pelo menos um tipo celular contaminante (por exemplo, pelo menos um queratinócito) na população celular.

[030] “Lesões da pele” se referem ao dano da pele devido ao trauma externo

ou interno. Por exemplo, lesões da pele podem ser causadas por acne e/ou outras reações inflamatórias que levam às cicatrizes ou ferimentos, doenças inerentes com pele frágil ou doenças bolhosas, tais como epidermólise bolhosa distrófica com ferimentos crônicos, doenças inflamatórias autoimunes crônicas, tais como esclerodermia e variantes, borreliose e outras infecções, lúpus eritematoso e variantes, líquen plano, psoríase, dermatite atópica, prurido. As lesões da pele também podem ocorrer devido aos procedimentos cirúrgicos ou ferimentos e acidentes. Os ferimentos podem ser causados por alguns fatores, incluindo diabetes e insuficiência venosa ou arterial. As lesões da pele também podem ser causadas por alguns fatores, incluindo queimaduras, o frio, radiação ou induzida por várias medicações. As lesões da pele também podem ocorrer devido ao “envelhecimento da pele” que se refere ao efeito negativo de vários fatores, incluindo, por exemplo, fumo, luz UV (envelhecimento extrínseco) e envelhecimento geral (envelhecimento intrínseco).

PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DE NBDS

[031]Conforme observado acima, a presente invenção fornece métodos para isolar células de NBDS. Em um aspecto da presente invenção, tais métodos compreendem as etapas de (a) preparar cabelo vital; e (b) cultivar o cabelo vital, tal que uma população de células de NBDS pode ser obtida. Com respeito à etapa (a), uma ampla variedade de métodos pode ser utilizada para obter cabelo vital, incluindo, por exemplo, métodos cirúrgicos para remover uma variedade de folículos pilosos (junto com a pele) ou arrancando um ou mais folículos pilosos diretamente a partir de um sujeito.

[032]Uma vez que o cabelo vital foi obtido, ele pode ser cultivado sob condições que permitem e, preferencialmente, promovem o crescimento de células de NBDS. Nas formas de realização preferidas, esta cultura ocorre sob condições em que as células do tipo fibroblasto são proliferadas. Nas formas de realização preferidas, a etapa de cultura é realizada com meio livre de soro. Depois de várias passa-

gens (por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, 5, 10 ou mais passagens), as células cultivadas são analisadas, conforme descrito acima, de modo a verificar se existe uma quantidade suficiente de células de NBDS e se as células foram suficientemente isoladas das células contaminantes.

[033]Em outro aspectos da invenção, os métodos são fornecidos compreendendo as etapas de (a) preparar cabelo vital; (b) clivar o cabelo preparado na etapa (a) para remover o bulbo do folículo piloso (que contém o copo da bainha dérmica e papila dérmica); (c) isolar o tecido da bainha dérmica não bulbar; e (d) cultivar o tecido da bainha dérmica não bulbar isolado para produzir células de NBDS.

[034]De modo a preparar cabelo vital (ou ‘vivo’), uma amostra é tipicamente obtida a partir de um dado sujeito (por exemplo, um mamífero, tal como um ser humano, cavalo, porco, gato, cão, coelho, porquinho-da-índia, rato ou camundongo). A amostra pode ser obtida a partir de uma variedade de sítios (por exemplo, para humanos, a partir da área occipital do couro cabeludo, do tórax ou coxa e para cavalos a partir da crina ou rabo). A amostra pode ser obtida por intermédio de uma biópsia ou outros meios adequados (por exemplo, “arrancando”, ou dissecação). Preferivelmente, os folículos pilosos na fase anágena de desenvolvimento são selecionados, embora outras fases de desenvolvimento (por exemplo, a fase catágena) também possam ser utilizadas.

[035]Uma vez que a amostra é obtida a partir do sujeito, a amostra depois é separada para isolar o folículo piloso, tipicamente, utilizando um micromanipulador e bisturi, embora outros instrumentos, tais como agulhas, também possam ser utilizados. Em certas formas de realização, o folículo piloso isolado, conforme mostrado na Figura 1A, pode ser ainda clivado acima da parte bulbar da raiz do cabelo (isto é, acima das células da papila dérmica e copo da bainha dérmica), mas abaixo da base do canal da glândula sebácea, de modo a obter uma bainha dérmica isolada (veja a Figura 1B). A estrutura representada na Figura 1B pode ser separada em pelo me-

nos dois componentes separados, conforme mostrado nas Figuras 1C e 1D. A Figura 1C representa a fibra do cabelo e bainha da raiz interna associada, e bainha da raiz externa que contém predominantemente queratinócitos, e Figura 1D é a bainha dérmica contendo células de NBDS (também ocasionalmente referidas como a bainha do tecido conjuntivo).

[036]A bainha dérmica (Figura 1D), em certas formas de realização, pode ser adicionalmente separada, por exemplo, através de corte longitudinal ao longo de um lado ou através do uso de técnicas, tais como digestão enzimática (por exemplo, com enzimas de digestão de colágeno, tais como colagenase, dispase e leupeptina).

[037]A bainha dérmica contendo células de NBDS ou as células de NBDS separada depois podem ser cultivadas em um meio (com ou sem soro) que promove a proliferação celular (veja, por exemplo, a Figura 3). Meio adequado incluem, por exemplo, DMEM/Hams F12 suplementado com fator de crescimento de fibroblastos (FGF), soro de bezerro/bovino fetal e antibióticos. Alternativamente, as células podem ser replicadas em um processo livre de soro, em que várias combinações de meio livre de soro e suplementos são utilizados. Os exemplos de meio livre de soro incluem X-Vivo™ e TheraPEAK™ FGM-CD™ contendo suplementos de soro e/ou extrato de plaquetas derivas de seres humanos. Depois de 3 a 5 dias, o meio de proliferação fresco é tipicamente adicionado ao meio de cultura. Subsequentemente, o meio pode ser modificado a cada 2 a 4 dias. Quando a cultura atingiu aproximadamente 80 a 90% de confluência, as células foram separadas do frasco de cultura, por exemplo, por intermédio de tripsinização, e semeadas em um frasco de tecido de cultura maior. Esta etapa é repetida durante algumas passagens (por exemplo, 2, 4 ou 6) até que aproximadamente 5 a 100 milhões de células são obtidas.

[038]Em certas formas de realização da invenção, as células podem ser cultivadas sob condições de baixa tensão de oxigênio (por exemplo, conforme descrito na Publicação de Patente U.S. Nº US 2013/0177537 que é integralmente incorpora-

da como referência).

[039]Uma vez que o número desejado de células é obtido, as células são lavadas várias vezes, tripsinizadas e recolocadas em suspensão em meio de transporte celular (CTM), que é composto de lactato de ringer, albumina de soro humano 10 a 20% (TEM) e sulfóxido de dimetila 2 a 5% (DMSO). As células são contadas e ajustadas para fornecer a concentração final de 20 milhões de células/ml e armazenadas em nitrogênio líquido.

[040]Todos os sobrenadantes de cultura celular não serão descarregados, conforme eles contêm fatores de crescimento individuais, moléculas de matriz, fatores de células tronco, feitos pelas células do paciente. Os sobrenadantes de cultura celular serão congelados, liofilizados ou qualquer outro método de armazenagem que será adequado para o uso específico.

PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO CÉLULAS DE NBDS

[041]Conforme observado acima, as células de NBDS podem estar contidas nas composições com outros ingredientes, tais como, por exemplo, soro ou plasma do sangue, plasma rico em plaquetas (PRP), fibrina e/ou ácido hialurônico. Outros produtos comercialmente disponíveis também podem ser utilizados para preparar composições adequadas, incluindo, por exemplo, TISSEEL e COSEAL (disponível a partir da Baxter), TISSUCOL, BERIPLAST, QUIXIL, TACHOSIL e EVICEL. Outras composições com base em polímero também podem ser utilizadas, incluindo, por exemplo, polietilenoglicóis, ácidos polilácticos e policaprolactonas. Em outras formas de realização, as células podem ser colocadas em matrizes extracelulares fabricadas ou coletadas (veja, por exemplo, o US 20100047305 ou US 20100124573). Em outras formas de realização, as células podem ser colocadas em um suporte não biodegradável ou biodegradável ou outra estrutura. Suportes ou estruturas particularmente preferidos incluem suportes biodegradáveis (por exemplo, suportes com

base em colágeno, tais como, por exemplo, malhas). Exemplos representativos de suportes adequados incluem, por exemplo, as Patentes U.S. N^{os} 5.736.372, 5.759.830, 8.039.258 e 8.105a380, as quais são integralmente incorporadas como referência.

[042]Em outras formas de realização preferidas, a composição é fornecida em uma ou duas ou mais partes (por exemplo, em uma seringa em forma de barril dupla que mistura os componentes ou em cartucho com duas ou múltiplas câmaras) que fluem livremente e são injetáveis. Exemplos representativos de tais seringas incluem aqueles descritos nas Patentes U.S. N^{os} 5.750.657 e 8.039.021 que são integralmente incorporadas como referência.

[043]Outros ingredientes também podem ser incluídos nestas composições, incluindo, por exemplo, componentes da matriz extracelular (por exemplo, glicosaminoglicanos (GAGs), sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, ácido hialurônico, elastina, colágenos, fibronectinas e lamininas), citocinas e quimioquinas (por exemplo, fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta) e suas isoformas, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e suas isoformas, fator estimulante de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), proteína relacionada ao hormônio da paratireoide, fator de crescimento de hepatócito/fator de dispersão (HGF/SF), proteína estimulante de macrófagos (MSP), fator de crescimento epidérmico (EGF), interleucina 6 (IL-6), fator de células tronco (SCF) fator derivado de células estromais 1 (SDF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) e/ou vários agentes terapêuticos (por exemplo, agentes analgésicos, agentes anti-inflamatórios, antibióticos, antimicóticos, antivirais e agentes imunomoduladores).

MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DA PELE UTILIZANDO CÉLULAS DE NBDS

[044]Métodos também são fornecidos para tratar ou prevenir envelhecimento

da pele ou lesões da pele, compreendendo a etapa de administrar a um sujeito uma composição compreendendo células de NBDS descritas acima. Tipicamente, as células são administradas por injeção, embora, em várias formas de realização, na medida em que um método cirúrgico é utilizado, as células possam ser diretamente fornecidas em, junto a ou debaixo de um ferimento aberto.

[045]Os fibroblastos são o tipo celular principal na derme da pele. Eles são alta e biologicamente ativos e para uma rede de múltiplas camadas e tridimensional de células, misturados com colágeno e conectados por intermédio de receptores de superfície, tais como integrinas. Existe uma renovação e quebra constante de fibras de colágeno através de enzimas, tais como uma MMP (metaloproteinases da matriz) que regulam o volume e firmeza da pele. Com o envelhecimento, exposição à UV ou fumo, o colágeno é degradado e não pode ser substituído pelo fibroblasto envelhecido. Os fibroblastos se tornam bastante inativos, mais redondos na aparência e produzem menos colágeno. Isto leva a uma pele mais fina com menos resistência elástica. Eventualmente, isto leva a uma pele envelhecida com pequenas linhas enrugadas, mas também rugas maiores, conforme observado na dobra nasolabial, na testa, nas bochechas e em outras partes.

[046]Assim, conforme observado acima, a presente divulgação fornece composições e métodos para tratar a pele de um sujeito, compreendendo a etapa de administrar à pele de um sujeito uma composição compreendendo células de NBDS, conforme descrito neste relatório. Em uma forma de realização, o sujeito é um mamífero selecionado a partir do grupo que consiste de seres humanos, cavalo, cães e gatos. Em várias formas de realização, o tratamento ocorre devido a uma lesão na pele. Em certas formas de realização, a lesão na pele pode resultar de trauma externo (por exemplo, um procedimento cirúrgico ou ferimento, queimadura, radiação ou um acidente) ou um ferimento ou cicatriz agudo ou crônico. Em outras formas de realização, a lesão na pele é uma predisposição de contusões espontâneas ou indu-

zidas nas extremidades. Ainda em outras formas de realização, a lesão na pele ocorre devido à acne e/ou outras reações inflamatórias que levam às cicatrizes, doença inerente com pele frágil, tais como epidermólise bolhosa distrófica ou outras doenças bolhosas inerentes ou adquiridas com ferimentos crônicos incorridos por diabetes mellitus, arteriosclerose ou varizes, infecções virais, micóticas ou bacterianas agudas ou crônicas, doença inflamatória autoimune crônica, tal como esclerodermia e variantes, infecção por borreliose, lúpus eritematoso e variantes, líquen plano, o efeito negativo do fumo e luz UV (envelhecimento extrínseco) e envelhecimento geral (envelhecimento intrínseco). Ainda em uma outra forma de realização, a pele está no corpo humano total ou uma parte selecionada do corpo (tal como as mãos, face e pescoço). Em outras formas de realização, a pele pode ser envelhecida/danificada pelo sol (luz UV) ou fumo. Nas formas de realização relacionadas, a pele envelhecida sofre de condições selecionadas a partir do grupo que consiste de rugas finas ou grossas, espessura da pele diminuída, elasticidade e firmeza diminuídas. Em outras formas de realização, a pele é tratada para propósitos cosméticos (por exemplo, para reduzir a aparência da celulite). Ainda em outras formas de realização, não existe lesão ou trauma visível presente à pele, mas a pele, não obstante, pode ser tratada, de modo a prevenir ou atrasar a incidência de envelhecimento normal ou para melhorar a aparência (e textura) da normal pele.

[047]Em várias formas de realização da invenção, as células de NBDS podem ser administradas por intermédio de um dispositivo, tal como aquele divulgado na Publicação PCT Nº WO 2013/113121 que é integralmente incorporada como referência.

[048]Um grande número de espécies pode ser tratado com células de NBDS e composições fornecidas neste relatório, incluindo, por exemplo, mamíferos, tais como seres humanos, cavalo, cães e gatos.

PROCEDIMENTOS COSMÉTICOS/ESTÉTICOS UTILIZANDO CÉLULAS

DE NBDS OU SOBRENADANTES DE CULTURA CELULAR DAS MESMAS

[049]Conforme debatido acima, uma variedade de sinais de envelhecimento da pele pode ser facilmente tratada e/ou prevenida por intermédio de injeção intracutânea (i.c), intradérmica ou subcutânea (s.c.) de células de NBDS. Em outras formas de realização, a pele de um sujeito pode ser tratada com uma composição compreendendo sobrenadantes de cultura celular de NBDS. Em várias formas de realização da invenção, a pele total de um sujeito (por exemplo, um ser humano) pode ser tratada, embora, em aspectos mais específicos, tratamentos cosméticos e estéticos possam ser fornecidos ao sujeito. Exemplos representativos de tais tratamentos incluem, mas não são limitados a: rugas finas e grossas nas bochechas, nariz, orelhas, testa, dobra nasolabial, pálpebras, em torno dos olhos (pé de galinha), em torno dos lábios, queixo, têmporas, pescoço, colo, mama, tronco, mãos e braços, pernas e pés. Essencialmente, todas as partes da pele que podem ser propensas ao dano por UV podem se beneficiar de tal tratamento. Além disso, aquelas partes do corpo que sofrem de perda de volume podem ser tratadas pela injeção de células de NBDS, conforme isto aumentará os volumes através da adição de células e, desse modo, colágeno, ou através do uso de composições compreendendo sobrenadantes de cultura celular de NBDS. Portanto, o aumento de tecido da orelha, lóbulos da orelha, nariz, lábios, bochechas, pescoço, colo, mamas, mamilos, órgãos genitais é outra forma de realização.

[050]Em várias formas de realização, as células de NBDS podem ser liberadas por intermédio de injeções que podem ser feitas com ou sem analgesia ou sedação local ou sistêmica. Isto pode ser feito com um dispositivo de única ou múltiplas agulhas. Além disso, pode ser realizado por uma injeção única como um bolo ou múltiplas injeções de múltiplas camadas com técnicas diferentes, tais como cruzamento, plumagem ou outros. Os volumes/números celulares grandes liberados dependem da indicação e da área que será tratada. Doses típicas podem ser inicia-

das a partir de 0,01 ml até vários ml. Em certos aspectos da invenção, os números celulares injetados podem variar de 10 a bilhões de células e, mais preferivelmente, de 100, 1.000, 10.000, 100.000, 1.000.000 e/ou 10.000.000 até um bilhão ou mais células. O número de células injetadas dependerá, entre outras coisas, do tamanho da área que será tratada, do número total de células disponíveis e do volume injetado, assim como do grau desejado de eficácia.

[051]Além disso, a injeção de células de NDBS em, em torno de, ou debaixo de um ferimento agudo ou crônico será benéfica para a cura do ferimento. Os ferimentos podem surgir a partir daquelas doenças definidas neste relatório.

[052]Ainda em outro aspecto da invenção, sobrenadantes de cultura celular de NDBS são fornecidos em uma preparação cosmética adequada. Especificamente, o sobrenadante de cultura celular pode ser aplicado à pele por si só, ou concentrado e misturado com outros ingredientes adequados para o uso como uma preparação cosmética. Excipientes adequados são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos 8.343.466, 8.343.520 e 8.349.338 e em "A Formulary of Cosmetic Preparations", 1977, por Michael Ash, todas as quais são integralmente incorporadas como referência.

[053]As composições compreendendo tais sobrenadantes de cultura celular de NDBS podem ser utilizadas para tratar pele normal, assim como uma variedade de lesões da pele. Conforme debatido em mais detalhes acima, uma lesão na pele pode resultar de trauma externo (por exemplo, um procedimento cirúrgico ou ferimento, queimadura, radiação ou um acidente) ou um ferimento ou cicatriz agudo ou crônico. Em outras formas de realização, a lesão na pele é uma predisposição de contusões espontâneas ou induzidas nas extremidades. Ainda em outras formas de realização, a lesão na pele ocorre devido à acne e/ou outras reações inflamatórias que levam às cicatrizes, doença inerente com pele frágil, tal como epidermólise bolhosa distrófica ou outras doenças bolhosas inerentes ou adquiridas com ferimentos

crônicos incorridos por diabetes mellitus, arteriosclerose ou varizes, infecções virais, micóticas ou bacterianas agudas ou crônicas, doença inflamatória autoimune crônica, tal como esclerodermia e variantes, infecção por borreliose, lúpus eritematoso e variantes, líquen plano, o efeito negativo do fumo e luz UV (envelhecimento extrínseco) e envelhecimento geral (envelhecimento intrínseco). Ainda em uma outra forma de realização, a pele está no corpo humano total ou uma parte selecionada do corpo (tal como as mãos, face e pescoço. Em outras formas de realização, a pele pode ser envelhecida/danificada pelo sol (luz UV) ou fumo. Nas formas de realização relacionadas, a pele envelhecida sofre de condições selecionadas a partir do grupo que consiste de rugas finas ou grossas, espessura da pele diminuída, elasticidade e firmeza diminuídas. Em outras formas de realização, a pele é tratada para propósitos cosméticos (por exemplo, para reduzir a aparência da celulite). Ainda em outras formas de realização, não existe lesão ou trauma visível presente à pele, mas a pele, não obstante, pode ser tratada, de modo a prevenir ou atrasar a incidência de envelhecimento normal ou para melhorar a aparência (e textura) da normal pele.

[054]Os exemplos seguintes ilustram a invenção e não devem ser entendidos como limitantes do escopo da invenção.

Exemplo 1

AMOSTRAGEM DE TECIDO

[055]Uma biópsia da pele a partir da área occipital do couro cabeludo é obtida a partir de um sujeito, como segue. Brevemente, uma vez que uma área apropriada do couro cabeludo foi selecionada, ela é raspada com barbeador, garantindo que alguma pelo permaneça. A área de biópsia depois é totalmente desinfetada e anestesiada. Uma vez que a anestesia faz efeito, uma punção profunda de 1 a 10 mm ou uma biópsia excisional é suavemente removida do sítio de biópsia e a incisão fechada com suturas que podem ser removidas 8 a 16 dias mais tarde. A biópsia da pele depois é embalada sob condições assépticas em um tubo de biópsia pré-

rotulado contendo meio de transporte.

Exemplo 2

ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS DE NBDS

[056]Um teste de esterilidade é realizado no meio em que a biópsia foi transportada para garantir que a amostra esteja livre de contaminação ou, alternativamente, se a amostra é contaminada, para garantir que o meio com antibióticos seja subsequentemente utilizado. A biópsia depois é lavada várias vezes para remover o meio de transporte da biópsia e quaisquer resíduos celulares para preparar o tecido para processamento subsequente. Os folículos pilosos são processados em Hams F10 através do corte do epitélio da pele com um bisturi estéril e “arrancando” ou dissecando a unidade do folículo piloso total a partir do tecido dérmico adjacente usando fórceps estéril. O folículo piloso é agarrado com um fórceps o mais perto possível à superfície da pele e o folículo exposto puxando para cima sobre o cabelo na unidade do folículo piloso. Os folículos na fase anágena (fase de crescimento do ciclo do cabelo, indicada pela bainha da raiz externa visível e DSC do bulbo do cabelo) são selecionados para processamento adicional.

[057]O isolamento de NBDS é realizado em Hams F10 primeiro separando as células do copo da bainha dérmica folicular e papila a partir do resto do folículo piloso usando um mini-bisturi ou agulha fina estéril e descartado. A bainha dérmica contendo células de NBDS é removida e o tecido é preparado para cultivo.

[058]Seis a dez tecidos de bainha dérmica são suavemente colocados em gel de ácido hialurônico 3% e cobertos com meio de cultura promotor de proliferação celular, tal como, por exemplo, DMEM/Hams F12 suplementado com FGF, FCS 10% e antibióticos. Depois de 3 a 5 dias, o meio de proliferação fresco é adicionado à cultura. Subsequentemente, o meio é modificado a cada 2 a 4 dias. Quando a cultura atinge aproximadamente 80 a 90% de confluência, as células são separadas do frasco de cultura por intermédio de tripsinização e semeadas em frascos de cultura

de tecido maiores. Esta etapa é repetida durante quatro passagens para obter aproximadamente 100 milhões de células.

[059]Uma vez que aproximadamente 100 milhões de células são obtidas, as células são lavadas com PBS, tripsinizadas e recolocadas em suspensão em meio de transporte celular (CTM: lactato de Ringer contendo albumina de soro humano 10% e sulfóxido de dimetila 5%). As células são sedimentadas através de centrifugação e agrupadas. O sobrenadante é aspirado e a pelota celular é recolocado em suspensão em CTM. Duas amostras/alíquotas celulares são removidas da mistura de célula-CTM para controle de qualidade e contagem celular. Depois que as células são contadas, elas são sedimentadas uma vez mais através de centrifugação e a pelota resultante é recolocada em suspensão em CTM para fornecer uma concentração final de 20 milhões de células/ml. Os produtos celulares finais são armazenados abaixo de -130 °C em nitrogênio líquido até o transporte.

Exemplo 3

PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS DE NBDS NA PELE

[060]A pele na face é primeiro preparada para injeção através de aplicação de uma analgesia tópica (por exemplo, EMLA creme) durante aproximadamente uma hora. Em seguida, a pele é lavada e desinfetada. Células de NMDS preparadas, conforme descrito acima, depois são injetadas na pele em uma maneira repetitiva, de modo a cobrir a superfície total da área de tratamento desejada. A pele pode ser esfriada com gelo, conforme necessário.

Exemplo 4

USO DE SOBRENADANTES DE CULTURA CELULAR NA PREPARAÇÃO COSMÉTICA

[061]Como um auxiliar, um seguimento ou como um tratamento de repouso sozinho, os sobrenadantes de cultura celular podem ser usados para um efeito benéfico sobre a estrutura, textura, aparência, umidade, espessura e firmeza da pele.

[062]Brevemente, os sobrenadantes de cultura celular tomados a partir das células de crescimento de NBDS, conforme descrito no Exemplo 2, podem ser usados sozinhos, concentrados ou dissolvidos em excipientes cosméticos típicos e aplicados à pele envelhecida ou lesionada.

[063]A presente divulgação fornece as seguintes formas de realização específicas, que não são limitantes na invenção, mas são exemplos das formas de realização divulgadas neste relatório.

1) Um método para isolar células de NBDS, compreendendo:

- (a) preparar cabelo vital;
- (b) clivar o cabelo preparado na etapa (a) para remover o bulbo do folículo piloso;
- (c) isolar o tecido da bainha dérmica não bulbar; e
- (d) cultivar o tecido da bainha dérmica não bulbar isolado para produzir células de NBDS.

2) O método, de acordo com a forma de realização 1, em que o dito cabelo vital é obtido através de biópsia a partir de um cabelo sobre o couro cabeludo de um sujeito.

3) O método, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 ou 2, em que as células de NBDS isoladas podem ser autólogas ou alogênicas.

4) O método, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 3, em que o dito cabelo é clivado utilizando um micromanipulador e bisturi ou tesouras.

5) O método, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 4, compreendendo ainda a etapa de conduzir digestão enzimática do dito tecido de bainha dérmica não bulbar isolado.

6) O método, de acordo com a forma de realização 5 em que a dita digestão enzimática é conduzida com collagenase hialuronidase, DNase, elastase, papaína,

protease tipo XIV, tripsina e dispase.

7) O método, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 1 a 6, em que as ditas células de NBDS são passadas em múltiplas passagens.

8) Uma composição compreendendo células da bainha dérmica não bulbar isoladas preparadas, de acordo com o método de qualquer uma das formas de realização 1 a 7.

9) Uma composição compreendendo células da bainha dérmica não bulbar isoladas.

10) Uma composição, de acordo com as formas de realização 8 ou 9, compreendendo ainda plasma do soro ou plasma rico em plaquetas (PRP).

11) Uma composição, de acordo com qualquer uma das formas de realização 8 a 10, compreendendo ainda fibrina e/ou ácido hialurônico.

12) Uma composição, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 8 a 11, compreendendo ainda componentes da matriz extracelular, citocinas, quimiocinas e agentes terapêuticos.

13) A composição, de acordo com a forma de realização 12, em que os ditos componentes da matriz extracelular são selecionados a partir do grupo que consiste de glicosaminoglicanos (GAGs), sulfato de heparina, sulfato de condroitina, sulfato de queratina, ácido hialurônico, elastina, colágenos, fibronectinas e lamininas.

14) A composição, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 8 a 13, compreendendo ainda um suporte.

15) A composição, de acordo com a forma de realização 14, em que o dito suporte é um suporte biodegradável.

16) A composição, de acordo com a forma de realização 12, em que as ditas citocinas são selecionadas a partir do grupo que consiste de fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta) e suas isoformas, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e suas isoformas, fator estimulante de colônia de granulócitos-

macrófagos (GM-CSF), proteína relacionada ao hormônio da paratireoide, fator de crescimento de hepatócito/fator de dispersão (HGF/SF), proteína estimulante de macrófagos (MSP), fator de crescimento epidérmico (EGF), interleucina 6 (IL-6), fator derivado de células estromais 1 (SDF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF).

17) A composição, de acordo com a forma de realização 12, em que os ditos agentes terapêuticos são selecionados a partir do grupo que consiste de agentes analgésicos, agentes anti-inflamatórios antibiótico, antiviral, antimicótico e agentes imunomoduladores.

18) Um método para tratar a pele, compreendendo a etapa de administrar à pele de um sujeito uma composição, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 8 a 17.

19) O método, de acordo com a forma de realização 18, em que o dito sujeito é um mamífero selecionado a partir do grupo que consiste de seres humanos, cavalo, cães e gatos.

20) O método, de acordo com as formas de realização 18 ou 19, em que o dito tratamento ocorre devido a uma lesão na pele.

21) O método, de acordo com a forma de realização 20, em que a dita lesão na pele é um ferimento agudo ou crônico ou uma cicatriz.

22) O método, de acordo com a forma de realização 18, em que a dita lesão na pele é um ferimento traumático incorrido por cirurgia, uma queimadura, radiação, ou acidente.

23) O método, de acordo com a forma de realização 18, em que a dita lesão na pele é uma predisposição de contusões espontâneas ou induzidas nas extremidades.

24) O método, de acordo com a forma de realização 18, em que a dita pele é pele envelhecida.

25) O método, de acordo com a forma de realização 24, em que a dita pele envelhecida sofre de uma condição selecionada a partir do grupo que consiste de rugas finas ou grossas, espessura da pele diminuída, elasticidade e firmeza diminuídas.

26) O método, de acordo com a forma de realização 18, em que a dita pele é uma subparte da pele em um ser humano selecionada a partir do grupo que consiste da face, pescoço e mãos.

27) Uma composição compreendendo sobrenadante celular de NBDS.

28) Uma composição compreendendo sobrenadante celular de NBDS preparado a partir das células de NBDS cultivadas, de acordo com o método de qualquer uma das formas de realização 1 a 7.

29) A composição, de acordo com as formas de realização 27 ou 28, em que a dita composição é diluída ou concentrada.

30) A composição, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 27 a 29, compreendendo ainda um excipiente.

31) A composição, de acordo com a forma de realização 30, em que o dito excipiente é um polímero.

32) A composição, de acordo com a forma de realização 30, formada em uma pasta, creme ou gel.

33) Uso de uma composição, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 27 a 32, para o tratamento de pele.

34) Um método para o tratamento da pele, compreendendo administrar à pele de um sujeito uma composição, de acordo com qualquer uma das formas de realização de 27 a 32.

[064]As várias formas de realização descritas acima podem ser combinadas para fornecer formas de realização adicionais. Todas as patentes U.S., publicações de pedido de patente U.S., pedidos de patente U.S., patentes estrangeiras, pedidos

de patente estrangeiros e publicações de não patente referidas neste relatório descritivo e/ou listadas na Application Data Sheet são integralmente incorporados neste relatório como referência. Os aspectos das formas de realização podem ser modificados, se necessário, para utilizar os conceitos das várias patentes, aplicações e publicações para fornecer ainda formas de realização adicionais.

[065]Estas e outras mudanças podem ser feitas às formas de realização na luz da descrição detalhada acima. Em geral, nas seguintes reivindicações, os termos usados não devem ser interpretados para limitar as reivindicações às formas de realização específicas divulgadas no relatório descritivo e nas reivindicações, mas devem ser interpretados para incluir todas as formas de realização possíveis junto com o escopo total de equivalentes aos quais tais reivindicações são intituladas. Consequentemente, as reivindicações não são limitadas pela divulgação.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de células da bainha dérmica não bulbar (NBDS) isoladas **CARACTERIZADO** pelo fato de que é para a fabricação de uma composição para tratar ou prevenir o envelhecimento da pele ou lesão da pele,

em que as ditas células da bainha dérmica não bulbar (NBDS) isoladas são preparadas pelo método que compreende:

(a) clivar o cabelo vital acima da parte bulbar da raiz do cabelo (isto é, acima das células da papila dérmica e copo da bainha dérmica, isto é, acima dos bulbos terminais), mas abaixo da base do canal da glândula sebácea, para remover o bulbo do folículo capilar;

(b) isolar o tecido da bainha dérmica não bulbar (NBDS);

(c) cultivar o tecido da bainha dérmica não bulbar (NBDS) isolado para produzir células da bainha dérmica não bulbar (NBDS); e

(d) passar as ditas células de bainha dérmica não bulbar (NBDS) em pelo menos quatro passagens;

em que as células da bainha dérmica não bulbar (NBDS) isoladas são pelo menos 95% puras, e tem pelo menos um tipo celular contaminante na população celular, e

em que as células da bainha dérmica não bulbar (NBDS) são isoladas de tecido natural à ultravioleta.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito tratamento é devido a uma lesão na pele.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita lesão na pele é um ferimento traumático incorrido por cirurgia, uma queimadura, radiação ou acidente.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a dita pele é pele envelhecida.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células da bainha dérmica não bulbar (NBDS) isoladas são autólogas.

6. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células de bainha dérmica não bulbar (NBDS) isoladas são alogênicas.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição compreende ainda células da bainha dérmica não bulbar (NBDS) sobrenadantes.

8. Uso, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição compreende ainda um excipiente e opcionalmente um polímero.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição é formada em uma pasta, creme ou gel.

10. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição compreende ainda plasma do soro ou plasma rico em plaquetas (PRP).

11. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição compreende ainda fibrina e/ou ácido hialurônico.

12. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a composição compreende ainda um suporte.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o dito suporte é um suporte biodegradável.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que cultivar o tecido isolado da bainha dérmica não bulbar (NBDS) compreende passar as células da bainha dérmica não bulbar (NBDS) ao longo de várias passagens em meio sem soro.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que cultivar o tecido isolado da bainha dérmica não bulbar (NBDS) compreende a cultura de células da bainha dérmica não bulbar (NBDS) sob condições de baixa

tensão de oxigênio.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda a classificação das células da bainha dérmica não bulbar (NBDS) isoladas para obter uma população de células da bainha dérmica não bulbar (NBDS) isoladas.

17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a classificação é por citometria de fluxo.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as células da bainha dérmica não-bulbar (NBDS) isoladas estão em combinação com queratinócitos.

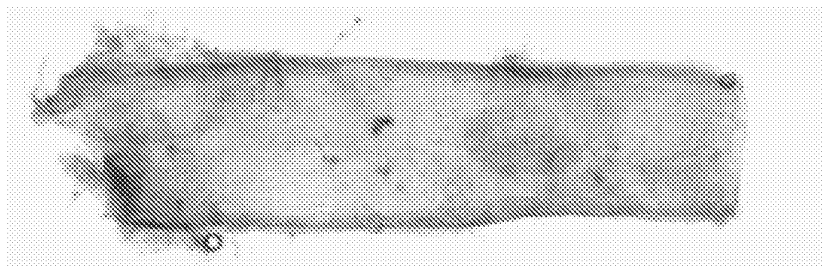


FIG. 1D

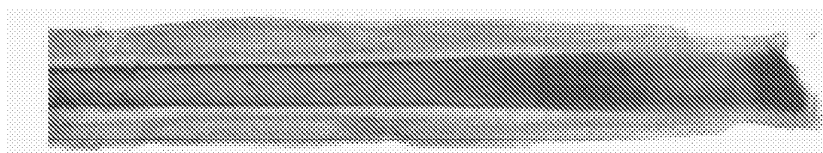


FIG. 1C

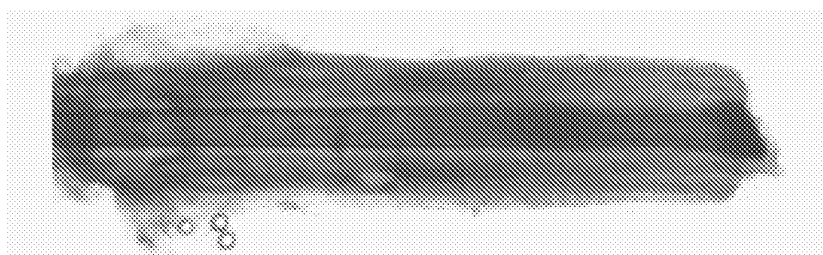


FIG. 1B

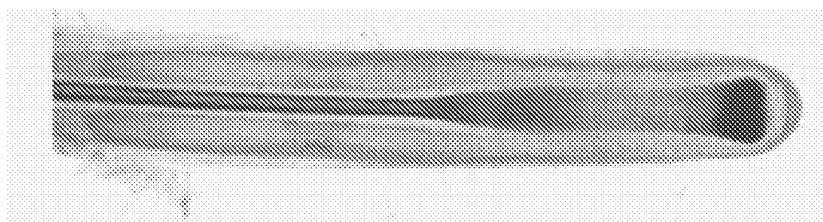


FIG. 1A

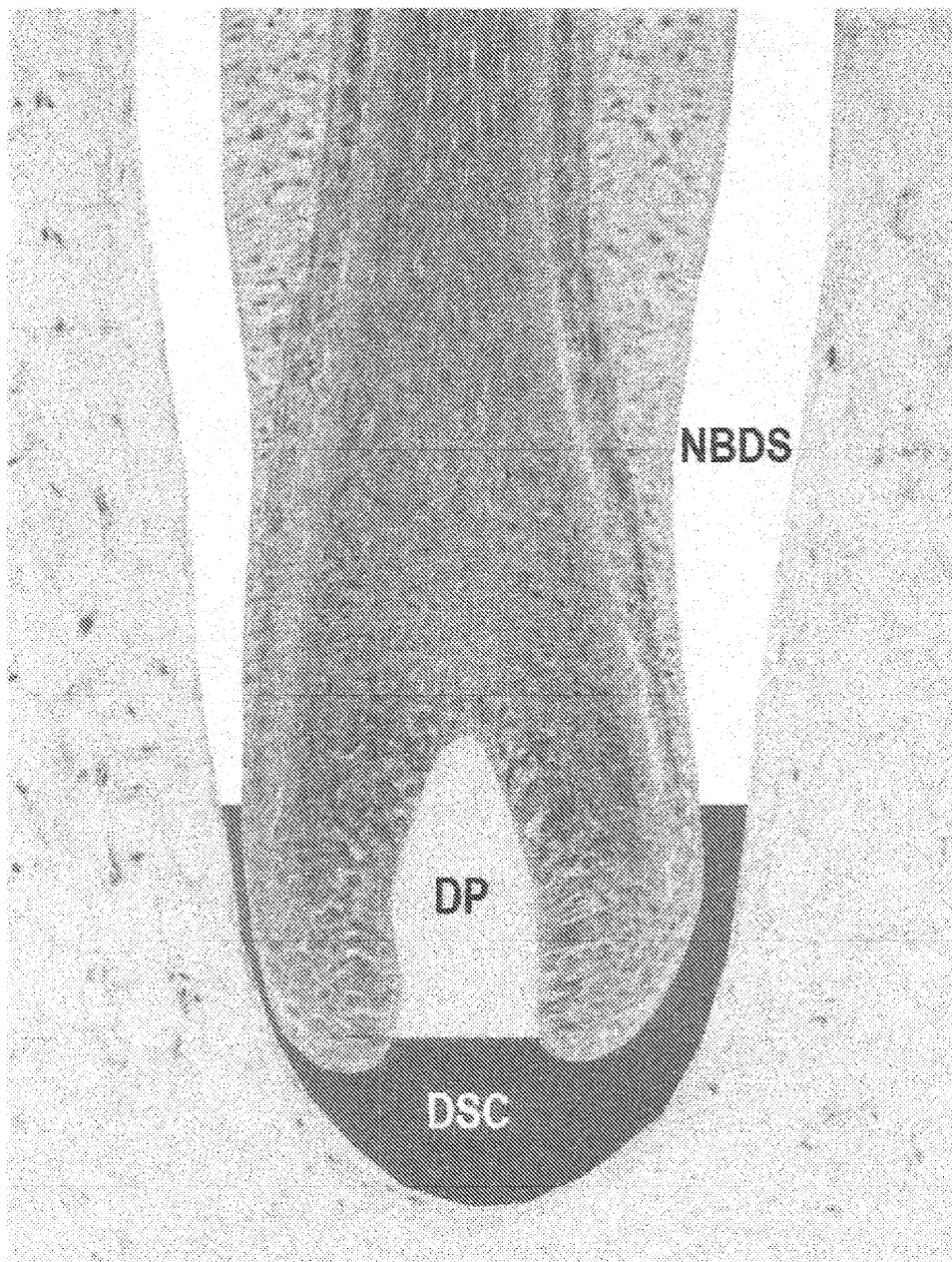


FIG. 2

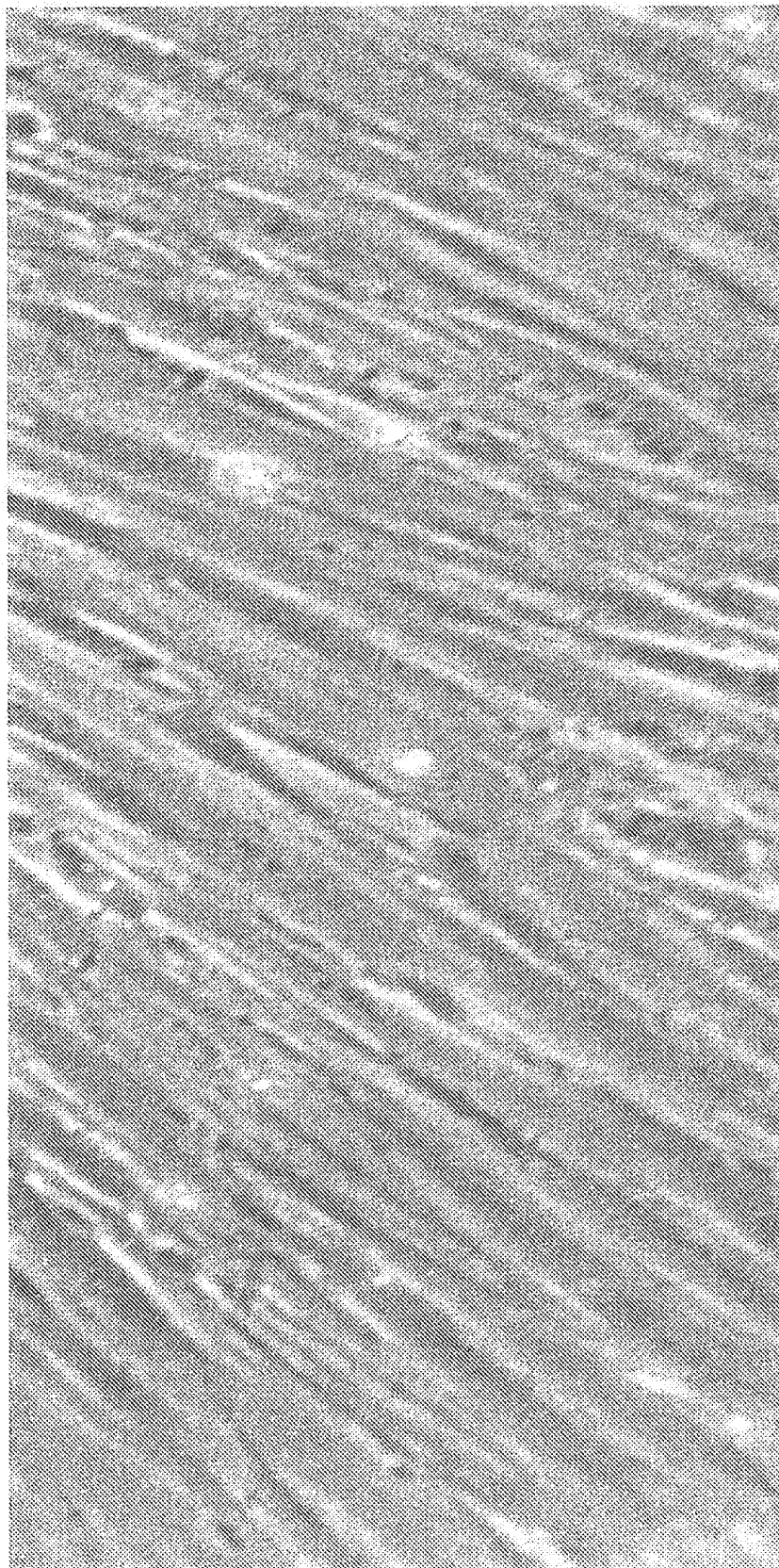


FIG. 3