

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 846 795**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
C12N 5/07 (2010.01)
A61K 35/545 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2015 PCT/JP2015/067789**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2016 WO16035419**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2015 E 15838432 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 3189844**

54 Título: **Células madres pluripotentes para el tratamiento de la úlcera cutánea diabética**

30 Prioridad:

05.09.2014 JP 2014181463

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2021

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF TOKYO (50.0%)
3-1, Hongo 7-chome, Bunkyo-ku, 1
Tokyo 113-8654, JP y
TOHOKU UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:

YOSHIMURA, KOTARO;
KINOSHITA, KAHORI y
DEZAWA, MARI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 846 795 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

Células madres pluripotentes para el tratamiento de la úlcera cutánea diabética

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una preparación celular para su uso en la medicina regenerativa. Más particularmente, la presente invención se refiere a una preparación celular que comprende células madre pluripotentes efectivas para la reparación y regeneración de tejido cutáneo en úlceras cutáneas, incluidas úlceras cutáneas causadas por diabetes, y a un método para tratar úlceras cutáneas que utiliza estas células madre pluripotentes.

Antecedentes de la técnica

15 La diabetes es una enfermedad que se asocia con un estado hiperglucémico persistente y se dice que ocurre como resultado de las acciones de un amplio intervalo de factores ambientales y genéticos. El principal factor regulador del azúcar en sangre es la insulina, y se sabe que la hiperglucemia se produce por deficiencia de insulina o por un exceso de factores que inhiben la acción de la misma (como la predisposición genética, falta de ejercicio, obesidad o estrés). La diabetes se clasifica como diabetes tipo 1, que se produce principalmente debido a una disminución en la función secretora de insulina pancreática atribuible a factores tales como enfermedades autoinmunes y la diabetes tipo 2, que es causada por una disminución en la función secretora de insulina pancreática o resistencia a la insulina causada por el agotamiento pancreático asociado a la persistencia de altos niveles de secreción de insulina. En Japón, la diabetes se ha convertido en una afección nacional moderna y más del 95 % de los pacientes diabéticos (que se estima que superan los 20 millones de personas cuando se incluyen personas en riesgo de aparición de diabetes) han sido diagnosticados con diabetes mellitus no insulino dependiente, y el aumento del número de pacientes se está convirtiendo en un problema que se acompaña de los cambios de estilo de vida. El número de personas que padecen diabetes en todo el mundo se ha estimado en aproximadamente 200 millones de personas (documento no de patente 1), y el mercado mundial de medicamentos antidiabéticos está en el orden de aproximadamente 1 billón de yenes. Esto hace que la diabetes sea la enfermedad mejor clasificada tanto en términos de tamaño del mercado como de población.

Muchas complicaciones graves de la diabetes, como enfermedades cardíacas, insuficiencia renal o ceguera, afectan a las personas con diabetes, y las complicaciones que afectan a las extremidades inferiores provocan el mayor daño. Entre el 40 % y el 70 % de todas las amputaciones de las extremidades inferiores están relacionadas con la diabetes mellitus y, en realidad, el 85 % de todas las amputaciones de las extremidades inferiores relacionadas con la diabetes ocurren luego de la aparición de úlceras en la pierna o el pie. Los pacientes que padecen diabetes mellitus tienen un mayor riesgo de aparición de úlceras cutáneas crónicas, como úlceras en la pierna y el pie, que se acompañan de complicaciones a largo plazo. Las úlceras ocurren como resultado de isquemia y/o trastornos nerviosos. La isquemia tisular local es la principal causa de úlceras diabéticas. De manera similar a la enfermedad de grandes vasos, los pacientes con diabetes tienen un mayor riesgo de perfusión cutánea asociada con arterias no conductoras durante el curso del deterioro del mecanismo de control de la microcirculación denominado aterosclerosis o enfermedad microvascular. En circunstancias normales, el flujo sanguíneo aumenta para promover la curación en respuesta a una lesión. Sin embargo, en los casos en los que hay enfermedad microvascular (o isquemia), esta respuesta se ve significativamente alterada, y esto se considera probablemente muy importante en la etiología de las úlceras junto con una tendencia a la aparición de trombosis en la microcirculación durante la reducción del flujo sanguíneo. Por otro lado, los trastornos nerviosos carecen de un método de tratamiento establecido adecuadamente con respecto a tanto al tratamiento sintomático de los mismos como a la prevención del deterioro progresivo de la función nerviosa, y es una de las principales complicaciones de la diabetes mellitus. Los efectos de los trastornos de los nervios periféricos son particularmente complejos. Aunque el mecanismo que conduce al daño nervioso asociado con la diabetes aún no se ha entendido completamente, se dice que involucra múltiples factores, como predisposición genética, anomalías metabólicas y vasculares o la falta de perturbación de factores de crecimiento relacionados.

La atención se dirige a la medicina regenerativa que mediante el uso de células madre pluripotentes para el tratamiento de las enfermedades refractarias antes mencionadas. Se sabe que las células estromales derivadas del tejido adiposo (ASC) son un tipo de estas células, y se cree que tienen la capacidad de diferenciarse no solo en adipocitos y vasos sanguíneos, sino también en varias otras células de tejido y líneas de tejido (documentos que no son de patente 2 a 4). Se ha informado de un intento de tratar la lesión isquémica mediante la producción de ratones diabéticos como ejemplo del uso de ASC (documento no de patente 5). Además, también se ha informado de un ejemplo de aplicación de células regenerativas derivadas de tejido adiposo en el tratamiento clínico de úlceras diabéticas de las extremidades inferiores de pacientes que padecen enfermedades arteriales periféricas (documento no de patente 6). Sin embargo, estos intentos no han llevado a una recuperación completa en el sitio lesionado.

Además, aunque se sabe que las células madre mesenquimales (MSC) que tienen la capacidad de diferenciarse en hueso, cartilago, adipocitos, células nerviosas o músculo esquelético y similares son ejemplos de células obtenidas del cuerpo adulto que tienen la capacidad de diferenciarse (no-Documentos de patente 7 y 8), estas constituyen una

población celular que incluye varias células, y el estado real de esa capacidad de diferenciación no se comprende completamente y han habido variaciones considerables en los efectos terapéuticos de las mismas. Además, aunque se ha informado que las células iPS son células madre pluripotentes derivadas de adultos (como se informa en el documento de patente 1, por ejemplo), además de que el establecimiento de células iPS requiere un procedimiento extremadamente complejo que consiste de introducir un gen específico en células mesenquimales en forma de fibroblastos cutáneos o introduciendo un compuesto específico en células somáticas, las células iPS también son altamente tumorigénicas, lo que resulta de esta manera en la presencia de obstáculos extremadamente difíciles para su aplicación clínica.

De acuerdo con una investigación realizada por Dezawa, uno de los inventores de la presente invención, las células madre pluripotentes presentes en una fracción de células mesenquimales que expresan un antígeno de superficie en forma de antígeno embrionario específico de etapa-3 (SSEA-3) (denominadas como células que se diferencian a múltiples linajes que soportan estrés de forma duradera (células Muse)) son responsables de la pluripotencia de esa fracción de células mesenquimales, y se determinó que tienen el potencial de aplicarse en el tratamiento de enfermedades dirigido a la regeneración de tejidos (documento de patente 2, documentos no de patente 9 a 12). Sin embargo, todavía no hay ejemplos que describan el uso de células Muse para la prevención y/o el tratamiento de úlceras cutáneas que demuestren claramente la obtención de los efectos terapéuticos anticipados.

[Documentos técnicos anteriores]

[Documentos de patente]

Documento de patente 1: Patente japonesa Núm. 4183742

Documentos de patente 2: Publicación Internacional Núm. WO 2011/007900

US 2012/244129 A1 describe células madre pluripotentes que pueden aislarse del tejido corporal.

WO 2014/027684 A1 describe células madre multipotentes que inducen la reparación y regeneración del infarto de miocardio.

[Documentos no patentes]

Documento no patente 1: Stumvoll, M. y otros, Lancet, vol. 365, pág. 1333-1346 (2005)

Documento no patente 2: Rehman, J. y otros, Circulation, vol. 109, pág. 1292-1298 (2004)

Documento no patente 3: Planat-Benard, V. y otros, Circulation, vol. 109, pág. 656-663 (2004)

Documento no patente 4: Miranville, A. y otros, Circulation, vol. 110, pág. 349-355 (2004)

Documento no patente 5: Kim, EK y otros, Plast. Reconstr. Surg., Vol. 128, pág. 387-394 (2011)

Documento no patente 6: Marino, G. y otros, J. Surg. Res., Vol. 185, pág. 36-44 (2013)

Documento no patente 7: Dezawa, M. y otros, J. Clin. Invest., Vol. 113, pág. 1701-1710 (2004)

Documento no patente 8: Dezawa, M. y otros, Science, vol. 309, pág. 314-317 (2005)

Documento no patente 9: Li, S. y otros, Cancer Gene Therapy, vol. 12, pág. 600-607 (2005)

Documento no patente 10: Kuroda, Y. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 107, pág. 8639-8643 (2010). El documento no patente 10 describe que las células Muse pueden tener ventajas prácticas para la medicina regenerativa. Se describe que las células Muse expresaron marcadores de linaje endodérmico, ectodérmico y mesodérmico después de la inyección en testículos de ratón; integradas en la piel, los músculos y el tejido hepático dañados; y diferenciadas en células que expresan los respectivos marcadores tisulares citoqueratina 14 (ectodérmica), distrofina (mesodérmica) y albúmina (endodérmica).

Documento no patente 11: Wakao, S. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 108, pág. 9875-9880 (2011)

Documento no patente 12: Kuroda, Y. y otros, Nat. Protoco., Vol. 8, pág. 1391-1415 (2013)

Descripción de la invención

[Problemas a resolver por la invención]

Un objeto de la presente invención es para proporcionar una nueva aplicación médica que mediante el uso de células madre pluripotentes (células Muse). Más específicamente, un objeto de la presente invención es para proporcionar una preparación celular para la prevención y/o el tratamiento de úlceras cutáneas que contiene células Muse.

[Medios para resolver los problemas]

Los inventores de la presente invención encontraron que, al administrar células Muse a ratones con úlcera cutánea diabética, las células Muse son capaces de reconstruir y reparar el tejido cutáneo que da como resultado la curación de la úlcera, lo que conduce de esta manera a la terminación de la presente invención.

Específicamente, la presente invención se define en las reivindicaciones anexas.

[Efectos de la invención]

La presente invención puede inhibir la progresión de la úlcera cutánea y reparar el tejido cutáneo mediante un mecanismo de regeneración del tejido cutáneo por el cual las células Muse se diferencian a células que constituyen el tejido cutáneo en el sitio de una úlcera cutánea tras la administración de las células Muse en ese sitio en un sujeto aquejado de úlcera cutánea.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] A. Dado que los ratones típicamente suelen tener un nivel inherentemente alto de capacidad de cicatrización de heridas que permite que las heridas cicatricen rápidamente, es difícil observar claramente las diferencias en la cicatrización de heridas al evaluar el efecto de cicatrización de heridas de un fármaco. En consecuencia, mediante el uso de ratones inmunodeficientes que padecían diabetes, que se caracterizan por una progresión deficiente de la cicatrización de heridas, se evaluó el efecto en la cicatrización de heridas. Para inducir la diabetes tipo 1, se inyectó intraperitonealmente estreptozotocina (STZ) a ratones SCID hembra de 5 semanas de edad después de ayunar durante 24 horas. Se investigó a los ratones para detectar hiperglucemia (glucosa en sangre > 300 mg/dl) 3 días después de la administración de STZ (150 mg/kg). Se repitió la administración de STZ (150 mg/kg) en el caso de que no se observara hiperglucemia. Se produjeron defectos en la piel del lomo de ratones DM-SCID de 9 semanas de edad. Figura 1B indica cambios típicos en los niveles de azúcar en sangre. Casi todos los ratones se volvieron hiperglucémicos después de una o dos inyecciones de STZ.

[Figura 2] Se sabe que las MSC secretan un factor de crecimiento necesario durante la fase inflamatoria y la fase de crecimiento celular de la cicatrización de heridas. Por lo tanto, los valores relativos de producción de factor de crecimiento en fracciones de células Muse y fracciones de células mesenquimales (MSC) cultivadas durante 48 horas en condiciones hipóxicas (1 % O₂) y las condiciones normóxicas se midieron mediante ELISA. Las citocinas medidas consistieron en HGF, SDF-1, PDGF-BB, VEGF, EGF, TGF-β, NGF-β, bFGF y TNF-α. La absorbancia a 450 nm se representa en el eje Y. Los valores se muestran como la media ± DE (n=3). Los asteriscos (*) indican P<0,05.

[Figura 3] Se evaluó secuencialmente la cicatrización de herida de los defectos cutáneos (diámetro: 6 mm) hasta el día 14. Se fotografiaron las heridas y se calculó la relación (%) del área de la herida con respecto al tamaño original de la herida mediante el uso de un software de análisis de imágenes digitales. Aunque se observó que la cicatrización de heridas era algo más lenta en los ratones SCID en comparación con los ratones de tipo salvaje (WT), la cicatrización de heridas en los ratones DM-SCID inducidos por STZ se vio afectada en mayor medida que en los ratones SCID. El cierre de la herida fue significativamente más rápido en los ratones DM-SCID tratados con la población de células Muse que en los ratones DM-SCID no tratados, y estos ratones demostraron una cicatrización de heridas favorable en comparación con los ratones DM-SCID tratados con MSC (* P<0,05).

[Figura 4] Esta indica los resultados de un análisis del complejo de Golgi humano en las heridas de ratones DM-SCID tratados con células Muse y MSC. Se observaron células positivas para el complejo de Golgi humano (comparable a las células Muse trasplantadas) en la epidermis y en la capa superior de ambas áreas de la herida tratadas con células Muse y MSC después de 14 días. Sin embargo, no se detectaron células positivas para el complejo de Golgi humano en ninguno de los grupos en las áreas circundantes no dañadas. Las células humanas trasplantadas se detectaron con una frecuencia mayor en las muestras tratadas con células Muse que en las muestras tratadas con MSC.

[Figura 5] El complejo de Golgi humano y un marcador de diferenciación (PECAM-1) se sometieron a doble tinción inmunohistoquímica para caracterizar las células Muse trasplantadas. Se sugiere que varias células que expresaban el complejo de Golgi humano se diferenciaron a células endoteliales vasculares en la dermis, ya que fueron positivas para PECAM-1.

Modo de realización de la invención

La presente invención se refiere a una preparación celular para prevenir y/o tratar la úlcera cutánea diabética que comprende células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 (células Muse). A continuación se proporciona una explicación detallada de la presente invención.

1. Enfermedades aplicables

La presente invención tiene como objetivo prevenir y/o tratar la úlcera cutánea mediante el uso de una preparación celular que comprende células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 (células Muse). Aquí, "úlcera cutánea" se refiere al daño en la piel normalmente causado por un defecto (exposición de la dermis o tejido subcutáneo) de la superficie del tejido causado por inflamación. Aunque no existen limitaciones en cuanto a las úlceras cutáneas que pueden prevenirse y/o tratarse mediante la preparación celular de la presente descripción, los ejemplos de las mismas incluyen úlcera cutánea diabética, úlcera por decúbito, úlcera por estasis venosa, úlcera arterial, úlcera por radiación, fascitis necrotizante y quemaduras de tercer grado. "Úlcera cutánea diabética" se refiere a una úlcera cutánea extremadamente refractaria causada por daño a las células endoteliales vasculares atribuible a la diabetes, y ejemplos de la misma incluyen úlceras del pie diabético y úlceras diabéticas de la parte inferior de la pierna. "Decúbito" se refiere a una úlcera crónica causada por la presión aplicada durante un período de tiempo prolongado

en un área de la piel. Este tipo de úlcera se conoce con frecuencia como escara. La "úlceras de estasis venosa" se produce debido a la congestión de sangre u otro fluido de una vena defectuosa. "Úlcera arterial" se refiere a piel necrótica en un área rodeada por arterias que tienen mala circulación. "Úlcera por radiación" indica una úlcera que se produce en la piel irradiada. La "fascitis necrotizante" indica una inflamación de los tejidos blandos que comienza con una infección bacteriana de la fascia superficial seguida de una rápida propagación de la necrosis. Además, "quemaduras de tercer grado" se refiere a quemaduras que se extienden hasta el grosor total de la capa dérmica y el tejido subcutáneo. De acuerdo con la presente invención, la preparación celular de la presente invención es efectiva para prevenir y/o tratar la úlcera cutánea diabética.

10 2. Preparación celular

(1) Células madre pluripotentes (Células Muse)

Dezawa, uno de los inventores de la presente invención, descubrió la existencia de las células madre pluripotentes usadas en la preparación celular de la presente invención, y las células se denominaron células multilineaje diferenciadoras que soportan estrés (Muse). Las células Muse se pueden obtener de la médula ósea, los adipocitos (Ogura, F. y otros, Stem Cells Dev., Vol. 23, pág. 717-728 (2014)) y tejido de la piel, como el tejido conectivo dérmico, y también están presentes esporádicamente en el tejido conectivo de varios órganos. Además, estas células tienen las propiedades de las células madre pluripotentes y las células madre mesenquimales, y se identifican como doble positivas para cada uno de los marcadores de superficie celular del antígeno embrionario específico de la etapa 3 (SSEA-3) y CD105. Por tanto, las células Muse o las poblaciones de células que contienen células Muse pueden aislarse del tejido corporal mediante el uso de estos marcadores de antígeno como indicadores. Además, las poblaciones de células que contienen células Muse se pueden concentrar mediante una exposición prolongada al estrés causado por hipoxia o a proteasas como la tripsina o dispasa. Los detalles sobre el aislamiento, la identificación y las características de las células Muse se describen en la Publicación Internacional Núm. WO 2011/007900. Además, como informaron Wakao, y otros. (2011, descrito previamente), en el caso del cultivo de células mesenquimales de médula ósea o piel y similares y el uso de esas células como población parental de células Muse, se determinó que todas las células positivas para SSEA-3 eran células positivas para CD105. Por tanto, en la preparación celular de la presente invención, en el caso del aislamiento de células Muse del tejido mesenquimatoso del cuerpo o células mesenquimales cultivadas, las células Muse pueden purificarse y usarse simplemente mediante el uso de SSEA-3 como marcador de antígeno. Además, en la presente descripción, las células madre pluripotentes (células Muse) o una población celular que contiene células Muse que se han aislado del tejido mesenquimatoso del cuerpo o células mesenquimales cultivadas mediante el uso de SSEA-3 como marcador antigénico pueden describirse simplemente como "Células positivas para SSEA-3".

En pocas palabras, las células Muse o las poblaciones de células que contienen células Muse se pueden aislar del tejido corporal (como el tejido mesenquimatoso) mediante el uso de solo un anticuerpo contra el marcador de superficie celular en la forma de SSEA-3 o mediante el uso de anticuerpos contra SSEA-3 y CD105. Aquí, un "cuerpo" se refiere al cuerpo de un mamífero. En la presente invención, un cuerpo no incluye óvulos fertilizados o embriones en una etapa de desarrollo anterior a la etapa de blastocito, pero incluye fetos y embriones en una etapa de desarrollo más allá de la etapa de blastocito, incluida la blástula. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, primates como humanos o monos, roedores como ratones, ratas, conejos o cobayas, así como también gatos, perros, ovejas, cerdos, vacas, caballos, burros, cabras y hurones. Las células Muse usadas en la preparación celular de la presente invención se distinguen claramente de las células madre embrionarias (ES) y las células iPS en que se aíslan directamente del cuerpo por medio de un marcador. Además, "tejido mesenquimatoso" se refiere al tejido presente en varios órganos tales como hueso, periostio, sangre, médula ósea, músculo esquelético, dermis, ligamentos, tendones, pulpa dental, cordón umbilical o sangre de cordón umbilical. Por ejemplo, las células Muse se pueden obtener de la médula ósea, la piel y el tejido adiposo. Las células Muse se usan preferentemente, por ejemplo, recolectando tejido mesenquimatoso de un cuerpo y aislando las células Muse de este tejido. Además, las células Muse también pueden aislarse de células mesenquimales cultivadas tales como fibroblastos o células madre mesenquimatosas de médula ósea mediante el uso de los medios de aislamiento mencionados anteriormente. Además, las células Muse usadas en la preparación celular de la presente invención pueden ser autólogas o heterólogas con respecto al receptor de un trasplante celular.

Como se describió anteriormente, aunque las células Muse o las poblaciones de células que contienen células Muse pueden aislarse del tejido corporal al ser positivas para el indicador SSEA-3 o al ser doblemente positivas para los indicadores SSEA-3 y CD105, se conocen varios tipos de células madre y células precursoras que se conoce están contenidas en la piel humana adulta. Sin embargo, las células Muse no son las mismas que estas células. Ejemplos de estas células madre y células precursoras incluyen células precursoras derivadas de la piel (SKP), células madre de células nerviosas (NCSC), melanoblastos (MB), células perivasculares (PC), células precursoras endoteliales (EP) y células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC). Las células Muse pueden aislarse mediante el uso de un indicador como la "no expresión" de marcadores exclusivos de estas células. Más específicamente, las células Muse pueden aislarse mediante el uso de la no expresión como indicador de al menos 1 y, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 marcadores seleccionados del grupo que consiste de CD34 (marcador para EP y ADSC), CD117 (c-kit) (marcador para MB), CD146 (marcador para PC y ADSC), CD271 (NGFR) (marcador para NCSC), NG2 (marcador para PC), vWF factor (factor von Willebrand) (marcador para EP), Sox10 (marcador para NCSC), Snail (marcador

para SKP), Slug (marcador para SKP), Tyrp1 (marcador para MB) y Dct (marcador para MB). Por ejemplo, aunque sin limitarse a ello, las células Muse se pueden aislar mediante el uso de la no expresión de CD117 y CD146, la no expresión de CD117, CD146, NG2, CD34 vWF y CD271, o mediante el uso de la no expresión de los 11 marcadores mencionados anteriormente como indicador.

5 Además, las células Muse que tienen las características mencionadas anteriormente usadas en la preparación celular de la presente invención tienen una pluralidad de propiedades, que comprende dicha pluralidad de propiedades:

- 10 (i) actividad telomerasa baja o ausente;
 (ii) capacidad para diferenciarse en células de cualquiera de las tres capas germinales;
 (iii) ausencia de proliferación neoplásica; y
 (iv) autorrenovación.

15 Aquí, la "actividad telomerasa baja o ausente" de i) se refiere a tener una actividad telomerasa baja o no poder detectar la actividad de la telomerasa en el caso de intentar detectar la actividad de la telomerasa mediante el uso, por ejemplo, el kit de detección de telomerasa Trapeze XL (Millipore). La baja actividad de la telomerasa se refiere a tener una actividad de telomerasa aproximadamente igual a la de las células somáticas en forma de fibroblastos humanos o que tiene una actividad de telomerasa igual a 1/5 o menos y preferentemente 1/10 o menos que la de las
 20 células Hela. Las células Muse mencionadas en ii) tienen la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) in vitro e in vivo, y pueden diferenciarse en, por ejemplo, células hepáticas, células nerviosas, células del músculo esquelético, células de músculo liso, osteocitos o adipocitos sometiéndolos a cultivo para inducir la diferenciación in vitro. Además, también pueden demostrar la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales in vivo en el caso de trasplantes en los testículos. Además, también tienen la capacidad de migrar y establecerse en órganos dañados (como el corazón, la piel, la médula espinal, el hígado o el músculo) y
 25 subsecuentemente diferenciarse en las células correspondientes a ese tejido al ser trasplantadas al cuerpo mediante inyección intravenosa. Aunque las células Muse mencionadas en iii) tienen la propiedad de proliferar a una tasa de crecimiento de aproximadamente 1,3 días durante el cultivo en suspensión, y dejar de crecer después de aproximadamente 14 días, después de crecer a partir de una sola célula y formar una masa celular similar a un
 30 cuerpo embriode durante cultivo en suspensión, cuando estas masas de células similares a cuerpos embrioides se someten a cultivo adherente, se reanuda el crecimiento celular y las células que han crecido a partir de las masas celulares comienzan a diseminarse. Además, estas células Muse también tienen la propiedad de no sufrir transformación maligna durante al menos seis meses en el caso de haber sido trasplantadas a los testículos. Además, las células Muse mencionadas en iv) tienen la capacidad de experimentar una autorrenovación. Aquí,
 35 "autorrenovación" se refiere a poder confirmar la diferenciación en células tridérmicas a partir de células contenidas en una masa celular similar a un cuerpo embriode obtenida por cultivo, en un cultivo en suspensión a partir de una sola célula Muse, mientras que al mismo tiempo se puede confirman nuevamente la diferenciación tridérmica y las masas de células similares a cuerpos embrioides durante el cultivo en suspensión después de la formación de masas celulares similares a cuerpos embrioides de próxima generación sometiéndolos nuevamente las células de la
 40 masa celular similar a cuerpos embrioides a cultivo en suspensión. La autorrenovación se puede repetir para un solo ciclo o una pluralidad de ciclos.

(2) Preparación y uso de la preparación celular

45 Aunque no se limita a ello, la preparación celular de la presente invención se obtiene suspendiendo las células Muse o la población celular que contiene células Muse obtenidas en la sección (1) antes mencionada en solución salina fisiológica o un tampón adecuado (tal como solución salina fisiológica tamponada con fosfato). En este caso, si el número de células Muse aisladas de tejido autólogo o heterólogo es bajo, las células pueden cultivarse antes del trasplante para aumentar el número de células hasta que se obtenga la densidad celular prescrita. Además, dado
 50 que las células Muse no experimentan una transformación neoplásica como se informó anteriormente (Publicación Internacional Núm. WO 2011/007900), la posibilidad de sufrir una transformación maligna es baja, de esta manera estas células son seguras incluso si las células recuperadas del tejido corporal están contenidas mientras se encuentran aún en un estado indiferenciado. Además, aunque no existen limitaciones particulares al respecto, las células Muse recuperadas se pueden cultivar en medio de crecimiento ordinario (tal como medio esencial mínimo α (α -MEM) que contiene suero de ternera al 10 %). Más específicamente, durante el cultivo y la proliferación de células Muse con referencia a la Publicación Internacional Núm. WO 2011/007900, se puede preparar una solución que contiene una densidad de células Muse prescrita seleccionando adecuadamente el medio y los aditivos (como
 55 antibióticos o suero). En el caso de administrar la preparación celular de la presente invención a un sujeto humano, se recogen aproximadamente varios mililitros de fluido de la médula ósea del hueso ilíaco humano, y después de permitir que las células proliferen hasta alcanzar un número de células que permita el aislamiento de una cantidad terapéutica efectiva de células Muse, por ejemplo, cultivando células mesenquimales de la médula ósea a partir del fluido de la médula ósea en forma de células adherentes, las células Muse pueden aislarse mediante el uso de un marcador de antígeno en forma de SSEA-3 como indicador para preparar un solución que contiene células Muse a una densidad prescrita. Alternativamente, las células Muse se pueden preparar en forma de preparación celular concentrando una población celular que contiene células Muse exponiéndolas al estrés causado por hipoxia o proteasa. Alternativamente, las células Muse autólogas se pueden preparar en forma de preparación celular aislando

las células Muse mediante el uso del marcador de antígeno SSEA-3 como indicador, seguido de un aumento del número de células cultivando hasta alcanzar una cantidad terapéutica prescrita.

5 Además, en el caso del uso de células Muse en una preparación celular, la preparación celular puede contener dimetilsulfóxido (DMSO) o albúmina sérica y similares para proteger las células y puede contener antibiótico para prevenir la contaminación y el crecimiento de bacterias. Además, otros componentes farmacéuticamente aceptables (como un portador, excipiente, agente desintegrante, tampón, emulsionante, agente de suspensión, agente calmante, estabilizador, conservante, antiséptico o solución salina fisiológica) o células o componentes distintos de las células Muse contenidas en células madre mesenquimales pueden también estar contenidos en la preparación celular. Una persona con experiencia normal en la técnica puede añadir estos factores y fármacos a la preparación celular en concentraciones adecuadas de los mismos. De esta manera, las células Muse pueden usarse como una composición farmacéutica que contiene varios tipos de aditivos.

15 El número de células Muse contenidas en la preparación celular preparada como se describe anteriormente se puede ajustar adecuadamente en consideración de factores tales como el sexo, la edad y el peso corporal del sujeto, el estado del área afectada o el estado de las células usadas para obtener un efecto deseado cuando se trata una úlcera cutánea (como la reconstrucción del tejido cutáneo). En los Ejemplos 3 a 5 que se describirán subsecuentemente, se examinaron varios efectos del trasplante de células Muse en un modelo de ratón diabético inmunodeficiente producido mediante la administración de estreptozotocina (STZ). Se obtuvieron efectos extremadamente superiores al administrar células positivas para SSEA-3 a ratones SCID que pesaban aproximadamente de 20 g a 30 g a $1,0 \times 10^5$ células/animal. Sobre la base de este resultado, se puede esperar obtener efectos superiores administrando una cantidad de células equivalente a $3,3 \times 10^6$ hasta 5×10^6 células/kg por mamífero individual. Además, los ejemplos de individuos incluyen, pero no se limitan a, ratones y humanos. Además, la preparación celular de la presente invención se puede administrar una pluralidad de veces (por ejemplo, de 2 a 10 veces) en un intervalo adecuado (por ejemplo, dos veces al día, una vez al día, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez al día, dos semanas, una vez al mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses o una vez cada seis meses) hasta obtener el efecto terapéutico deseado. Por tanto, aunque varía de acuerdo con el estado del sujeto, la cantidad terapéuticamente efectiva es preferentemente, por ejemplo, una dosis de 1×10^3 células a 1×10^7 células por individuo administradas de 1 a 10 veces. Los ejemplos de la dosis total administrada por individuo incluyen, pero no se limitan a, 1×10^3 células a 1×10^8 células, 1×10^4 células a 5×10^7 células, 2×10^4 células a 2×10^7 células, 5×10^4 células a 5×10^6 células y 1×10^5 células a 1×10^6 células.

3. Producción de un modelo de úlcera cutánea diabética de ratón y efecto terapéutico de las células muse

35 En la presente descripción, se puede producir un modelo de úlcera cutánea diabética de ratón y usarlo para examinar los efectos terapéuticos de la preparación celular de la presente invención sobre la úlcera cutánea. Aunque no existen limitaciones particulares al respecto, los ejemplos de ratones usados en este modelo incluyen típicamente ratones SCID y ratones Balb/c. El modelo de úlcera cutánea diabética se puede producir mediante la administración intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) a estos ratones. STZ es un derivado de la glucosa que daña las células β del páncreas y se usa para provocar la aparición de diabetes en animales. De acuerdo con la presente invención, la dosis de STZ es preferentemente de 150 mg/kg por administración y puede administrarse varias veces.

45 Dado que la preparación celular de la presente invención comprende células Muse derivadas de humanos, las células son heterogéneas con respecto a los ratones a los que se les administra la preparación. Normalmente, en experimentos en modelo de ratones en los que se les administran células de diferentes especies, se administra un inmunosupresor (tal como la ciclosporina) antes o simultáneamente a la administración de las células heterólogas para suprimir el rechazo de las células heterólogas en el cuerpo. Los inventores de la presente invención encontraron previamente que una población parental de células Muse en forma de células mesenquimales demuestra inherentemente una potente inmunosupresión y que las células Muse también demuestran una acción similar. Por tanto, en la presente invención, no se requiere el uso de un inmunosupresor en un modelo de ratón distinto de los ratones SCID en los que no se usa un inmunosupresor.

55 En una modalidad de la presente invención, la preparación celular de la presente invención es capaz de reconstruir tejido normal mediante el tratamiento de la úlcera cutánea de un paciente. Aquí, "reconstruir tejido normal" se refiere a un área afectada que tiene una úlcera cutánea que se trata completamente como resultado de la curación de la herida. El estado de la piel reconstruida es preferentemente de manera que la superficie de la misma esté completamente cubierta con queratinocitos epidérmicos y se haya completado la epitelización. Además, la dermis de un grosor adecuado se construye con mayor preferencia debajo de la epidermis. Aún con mayor preferencia, se regeneran adicionalmente apéndices de la piel tales como glándulas sudoríparas y/o folículos pilosos.

60 De acuerdo con otro modo de la presente invención, se pueden hacer que se secreten varias citocinas de las células Muse cultivando las células Muse en un estado hipóxico (tal como a una concentración de oxígeno del 1 %) (véase el Ejemplo 3). Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para aumentar la capacidad de producción de al menos una citocina entre VEGF, EGF, PDGF-BB, NGF- β , SCF, TNF- α , bFGF y TGF- β .

65

EjemplosEjemplo 1: Preparación de células muse humanas5 (1) Muestreo de tejidos humanos y preparación celular

Los lipoaspirados se adquirieron mediante cirugía de liposucción de abdomen y/o muslos de cinco mujeres no obesas (edad: $26,6 \pm 8,7$ años, IMC: $21,5 \pm 2,0$) de quienes se obtuvo el consentimiento con la aprobación del comité de ética de la Escuela de Graduados de Medicina y Facultad de Medicina de la Universidad de Tokio. Las fracciones vasculares estromales (FVS) que contienen células madre/estromales derivadas de tejido adiposo (ASC) se aislaron del tejido adiposo aspirado como se describió anteriormente Yoshimura, K. y otros, J. Cell Physiol., Vol. 208, pág. 64-76 (2006)). En pocas palabras, el tejido adiposo aspirado se lavó con PBS y se digirió en PBS que contiene colagenasa al 0,075 % durante 30 minutos a 37 °C en un agitador. Los adipocitos maduros y el tejido conjuntivo se separaron del precipitado mediante separación por centrifugación. A continuación, el precipitado de células se resuspendió y se lisó pasando a través de mallas de 100 μm , 70 μm y 40 μm . El precipitado celular que contiene células madre/estromales derivadas de tejido adiposo (ASC) (equivalente a SVF) se cultivó en una placa de cultivo que contenía medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Nissui, Tokio, Japón) enriquecido con suero fetal bovino (FBS) al 10 %. Las ASC que proliferaron aproximadamente 2 semanas después del cultivo se subcultivaron mediante el uso del mismo medio. La segunda generación de hASC subcultivadas se recuperó en el transcurso de 5 minutos a 37 °C mediante el uso de tripsina al 0,25 % que contiene EDTA 2 mM y luego se usó para aislar células Muse.

(2) Aislamiento de células muse

25 Se usó un separador de células magnético (MACS, autoMACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) para recuperar las células Muse positivas para SSEA-3. Dado que las células Muse expresaron SSEA-3 en su superficie, se usaron para MACS anticuerpos anti-SSEA-3 acoplados a ficoeritrina (PE, dilución 1:3, Miltenyi Biotec) y microperlas anti-PE (dilución 1:2, Miltenyi Biotec) aislamiento de las células Muse. Las células diana marcadas con microperlas quedaron atrapadas en el campo magnético seguido de una recuperación en forma de fracción positiva. 30 La solución celular que no se unió a la columna magnética se recuperó en forma de fracción negativa. Se usó un programa MACS en el que la solución celular se aplicó dos veces a la columna magnética a una velocidad extremadamente lenta para purificar más favorablemente las células Muse. La fracción de células positivas resultante se usó en los siguientes ejemplos como una población de células Muse, mientras que la fracción de células negativas se usó como fracción de células mesenquimales (MSC).

Ejemplo 2: Producción de modelo de ratones diabéticos inmunosuprimidos

Se adquirieron ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) de cinco semanas de edad (C. B17/lcr-scid scid/scid) de Clea Japan, Inc. (Tokio, Japón). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo con la aprobación del Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales de la Universidad de Tokio. Después de permitir que los ratones SCID ayunaran durante 24 horas, los animales se inyectaron intraperitonealmente con solución salina tamponada con citrato recién preparada (pH 4,5) que contiene estreptozotocina (STZ, 150 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis MO). Los niveles de glucosa en sangre se midieron mediante el uso de un glucómetro y tiras reactivas (Glucose Pilot, Aventir Biotech LLC, Carlsbad, CA) el tercer día después de la inyección de STZ. Se consideró que los ratones tenían diabetes mellitus (DM) si el nivel de glucosa en sangre excedía los 300 mg/dl. Los ratones que no mostraron hiperglucemia (nivel de glucosa en sangre superior a 300 mg/dl) se sometieron a una segunda ronda de inyección de STZ (150 mg/kg) seguida de un seguimiento de los niveles de glucosa en sangre tres días después.

50 Los defectos de la piel se produjeron en la espalda de los ratones como se describió anteriormente (ver Galiano, RD y otros, Wound Repair Regen., Vol. 12, pág. 485-492 (2004) y Tepper, OM, Diabetes, vol. 10, 2337/db09-0185) para evaluar la cicatrización de heridas cutáneas. Más específicamente, cada ratón se anestesió mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital (65 mg/kg). Después de afeitar el lomo de los animales con una cortadora eléctrica y una crema depilatoria, se produjeron mediante el uso de un perforador de biopsia circular esterilizado (Kai Industries Co., Tokio, Japón), dos heridas cutáneas de espesor total (diámetro: 6 mm) que penetraban en la capa dermomuscular del lomo de los ratones. Se colocó una férula de silicona en forma de rosquilla (lámina de caucho de silicona con un diámetro interior de 9 mm, un diámetro exterior de 15 mm y un grosor de 1,0 mm, Kyowa Industries, Saitama, Japón) sobre las heridas y se fijó en su posición mediante el uso de una sutura de nailon 6-0 para evitar la contracción de la herida (FIG. 1A). Se usó un vendaje oclusivo (Perme-roll, Nitto Medical, Osaka, Japón) para evitar que la herida se seque y formara una costra.

Se prepararon cinco grupos experimentales que consistían en ratones de tipo salvaje, ratones SCID no DM, ratones SCID con DM inducida, ratones SCID con DM inducida tratados con la población de células Muse y ratones SCID con DM inducida tratados con la fracción de células mesenquimales (MSC). Se usaron seis ratones en cada grupo. Se mezclaron Células Muse ($1,0 \times 10^5$ células/ratón) con 0,1 ml de ácido hialurónico reticulado (Restylane, Q-MED, Uppsala, Suecia) seguido de inyección subcutánea alrededor de las heridas. Se investigó macroscópicamente la

cantidad de tiempo hasta el cierre de la herida (número de días hasta la regeneración epidérmica completa). Las heridas se fotografiaron secuencialmente los días 0, 3, 7, 10 y 14 mediante el uso de una cámara digital ordinaria (IXY Digital 90, Canon, Tokio, Japón). Las fotografías se evaluaron mediante el uso de un software de análisis de imágenes (Photoshop CS6, Adobe Systems, San José, CA) seguido de la medición del área de la herida.

5

Ejemplo 3: Ensayo de producción de citocinas (ELISA)

Se sabe que las MSC secretan factores de crecimiento (como PDGF, bFGF, TGF-β o EGF) necesarios en la fase inflamatoria y la fase de crecimiento celular de la cicatrización de heridas (Maxson, S. y otros, Stem Cells Transl. Med., Vol. 1, pág. 142-149 (2012)). Por lo tanto, la población de células Muse y MSC se cultivaron in vitro en condiciones hipóxicas y normóxicas para examinar las citocinas secretadas en el medio de cultivo. El experimento se llevó a cabo de la manera que se indica más abajo. $4,0 \times 10^5$ de células de la población de células Muse y MSC se diseminaron en un plato de cultivo de 60 mm seguido de cultivo en DMEM libre de suero bajo condiciones hipóxicas (1 % O₂) y normóxicas (6 % O₂). El medio de cultivo se recuperó 48 horas después y se filtró mediante el uso de un filtro de 0,22 μm (Filtro Millex-GV, Millipore, Billerica, MA). Las cantidades de citocinas secretadas en el medio de cultivo se compararon y examinaron mediante el uso de un kit de ELISA para factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) (ambos disponibles en R&D Systems, Minneapolis, MN), y mediante el uso de un kit de arreglo de citocinas para factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), factor de crecimiento nervioso-β (NGF-β), factor derivado de células madre (SCF), factor de necrosis tumoral α (TNF-α), factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y factor de crecimiento transformante-β (TGF-β) (Signosis # EA-1101, Santa Clara, CA). La absorbancia se midió a 450 nm por espectrofotometría mediante el uso de un lector de microplacas Infinite (M1000, Tecan Group, Mannedorf, Suiza).

Los resultados del cultivo adherente de la población de células Muse y MSC en condiciones normóxicas (6 % O₂) e hipóxicas (1 % O₂) y la comparación de las concentraciones de citocinas presentes en el medio de cultivo 48 horas después se muestran en la FIG. 2. Se detectaron cantidades superiores de EGF, PDGF-BB, NGF-β, SCF, TNF-α, bFGF y TGF-β en la población de células Muse en comparación con las MSC cultivadas a la misma presión de oxígeno. Además, las concentraciones de VEGF, EGF, PDGF-BB, NGF-β, SCF, TNF-α, bFGF y TGF-β fueron más altas en la población de células Muse en condiciones hipóxicas que las concentraciones en condiciones normóxicas de las mismas.

Ejemplo 4: Cicatrización de heridas en ratones DM-SCID

Aunque la estreptozotocina (STZ) indujo DM tipo 1 al dañar las células β del páncreas, la dosis de administración y el método de STZ difirieron de los de informes anteriores (ver Schmidt, RE y otros, Am. J. Pathol., Vol. 163, pág. 2077-2091 (2003); Lee, RH y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, vol. 103, pág. 17438-17443 (2006); y Schmidt, RE y otros, Exp. Neurol., Vol. 209, pág. 161-170 (2008)). Cuando se administró STZ a 200 mg/kg, muchos de los ratones SCID murieron dentro de la semana 1 siguiente a la administración debido a una pérdida de peso severa y anomalías metabólicas. Sin embargo, cuando se inyectó STZ en ratones SCID 24 horas después del inicio del ayuno a 150 mg/kg, se pudo inducir hiperglucemia de manera comparativamente consistente y un estado de DM (nivel de glucosa en sangre superior a 300 mg/dl) que continuó durante más de 30 días (Figura 1B). Aquellos ratones SCID en los que se indujo DM con éxito mediante la inyección de STZ en una sola administración (9 de 29 ratones: 31,0 %) o después de dos administraciones (13 de 29 ratones: 44,8 %) se usaron en un experimento de cicatrización de heridas durante 30 días después la inyección final de STZ.

La cicatrización de heridas se retrasó significativamente en ratones DM-SCID en comparación con ratones de tipo salvaje (WT) (n=6) o ratones no DM-SCID (n=6) (Figura 3). Aunque los ratones WT y los ratones sin DM-SCID demostraron tamaños de herida de $56,9 \pm 12,0$ % y $67,5 \pm 6,5$ %, respectivamente, el día 7, los ratones DM-SCID (n=6) mostraron tamaños de herida de $95,4 \pm 3,1$ % (WT vs. DM-SCID: P<0,0001). Además, los ratones DM-SCID también demostraron tamaños de heridas más grandes que los ratones WT o los ratones sin DM-SCID el día 14. Por tanto, se confirmó que los ratones DM-SCID eran un modelo animal de inmunodeficiencia asociada con una cicatrización de heridas deteriorada.

Las úlceras cutáneas entre los ratones DM-SCID se trataron inyectando subcutáneamente la población de células Muse o MSC. Los ratones DM-SCID tratados con células Muse (n=6) demostraron una cicatrización de heridas superior a la de los ratones DM-SCID tratados con MSC (n=6). Los tamaños de las heridas en el día 7 de los ratones DM-SCID tratados con células Muse y MSC fueron $51,05 \pm 7,2$ % y $74,0 \pm 6,6$ %, respectivamente (P<0,0001). El día 14, aunque las heridas de los ratones DM-SCID tratados con células Muse habían cicatrizado completamente, el tamaño de la herida de los ratones DM-SCID tratados con MSC era todavía del $30,6 \pm 6,7$ % (P=0,0235). Entre los ratones DM-SCID tratados con células Muse, la cicatrización de heridas se aceleró y pareció ser comparable a la del grupo WT.

Ejemplo 5: Análisis histológico

65

5 Se incluyeron muestras de piel de ratón en compuesto OCT (Sakura Finetek, Tokio, Japón), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se seccionaron. Las secciones congeladas (8 µm) se colocaron en portaobjetos y se dejaron secar durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguido de fijación durante 1 minuto con paraformaldehído al 4 % (en PBS) y lavado durante 5 minutos con PBS. A continuación, se tiñeron los portaobjetos con hematoxilina y eosina (H&E) y se trataron para análisis inmunohistoquímico.

10 El análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo como se describió anteriormente (ver Kuroda, Y. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, vol. 107, pág. 8639-8643 (2010)). Con el fin de detectar la proteína de Golgi humana por medio de la reacción de peroxidasa de rábano picante (HRP), los portaobjetos se trataron durante 30 minutos con metanol que contiene peróxido de hidrógeno al 0,3 % para desactivar la actividad de peroxidasa intrínseca y luego se incubaron secuencialmente con un anticuerpo de conejo anti proteína de Golgi 58K humana (Dilución 1:100, Abcam, Cambridge, Reino Unido) y un anti-conejo IgG-HRP de burro (dilución 1:500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). La expresión de la proteína de Golgi 58K humana se visualizó por una reacción de peroxidasa mediante el uso de tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB). Las secciones congeladas se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios para observar con un microscopio de barrido láser confocal: anti-mitochondrias humanas de ratón (dilución 1:100, Abcam), anti-proteína de Golgi 58K humana de conejo, anti-CK14 humana de conejo (1:200 dilución, Abcam) o anti-molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias humanas de cabra (PECAM-1, dilución: 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). A continuación, las secciones se incubaron con los siguientes anticuerpos secundarios: anti-ratón IgG-Alexa488 de burro, anti-conejo IgG-Alexa680 de burro o un anti-cabra IgG-Alexa488 de conejo (todas diluciones 1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los núcleos se contratiñeron con DAPI y se examinaron mediante el uso de un microscopio confocal (C1si Nikon, Nikon, Tokio, Japón).

25 De acuerdo con el análisis inmunohistoquímico del complejo de Golgi humano, se demostró que las células trasplantadas se detectaban en la epidermis y en la capa dérmica superior en cada una de las muestras tratadas con la población de células Muse y MSC el día 14. Sin embargo, no se observaron células que expresaban el complejo de Golgi humano en las áreas circundantes no dañadas (Figura 4). Además, se detectó la deposición del ácido hialurónico inyectado en la capa subcutánea. Además, varias células que expresaron el complejo de Golgi humano dentro de la dermis fueron positivas para h-PECAM-1 (Figura 5). Estos datos sugieren que las células Muse trasplantadas son viables tanto en la epidermis como en la dermis y son capaces de diferenciarse en queratinocitos epidérmicos y células endoteliales vasculares.

Aplicabilidad industrial

35 La preparación celular de la presente invención es capaz de reconstruir y reparar tejido cutáneo administrando a un área afectada por úlcera cutánea en un modelo de ratón de úlcera cutánea diabética y, por lo tanto, puede aplicarse al tratamiento de la úlcera cutánea diabética.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación celular para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la úlcera cutánea diabética, que comprende células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 aisladas de tejido mesenquimatoso biológico o células mesenquimales cultivadas en la que dichas células madre pluripotentes tienen una pluralidad de propiedades, comprendiendo dicha pluralidad de propiedades:
- 10 (i) ser positivas para CD105;
(ii) actividad telomerasa baja o ausente;
(iii) capacidad para diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales;
(iv) ausencia de proliferación neoplásica; y
(v) capacidad de autorrenovación.
- 15 2. La preparación celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una fracción celular en la que las células madre pluripotentes positivas para SSEA-3 se han concentrado mediante estimulación de estrés externo.
- 20 3. La preparación celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que las células madre pluripotentes son negativas para CD117 y negativas para CD146.
4. La preparación celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las células madre pluripotentes son negativas para CD117, negativas para CD146, negativas para NG2, negativas para CD34, negativas para vWF y negativas para CD271.
- 25 5. La preparación celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que las células madre pluripotentes son negativas para CD34, negativas para CD117, negativas para CD146, negativas para CD271, negativas para NG2, negativas para vWF, negativas para Sox10, negativas para Snail, negativas para Slug, negativas para Tryp1 y negativas para Dct.
- 30 6. La preparación celular para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que las células madre pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse en una o más células seleccionadas del grupo que consiste en queratinocitos epidérmicos, células endoteliales vasculares, pericitos vasculares, adipocitos, preadipocitos fibroblastos cutáneos y células de la envoltura nerviosa.

35

FIGURA 1

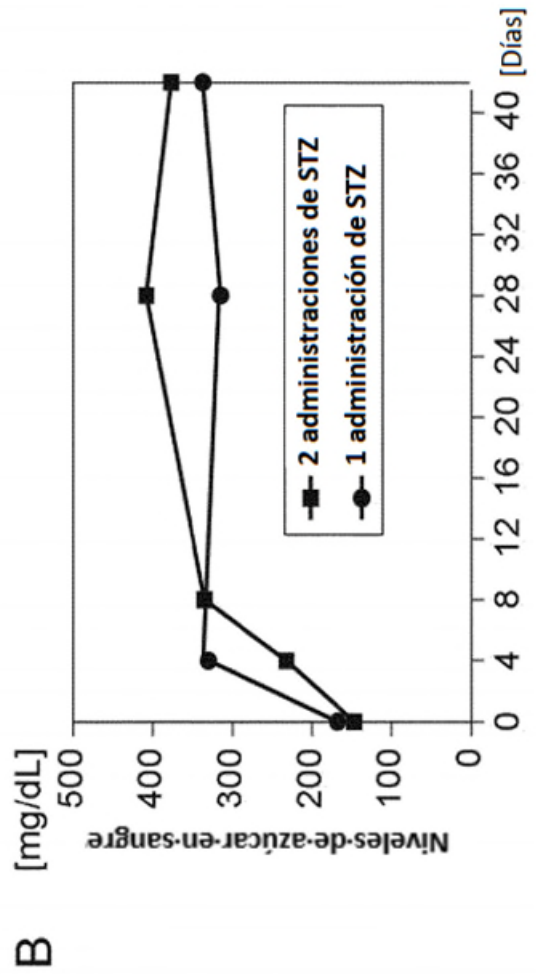
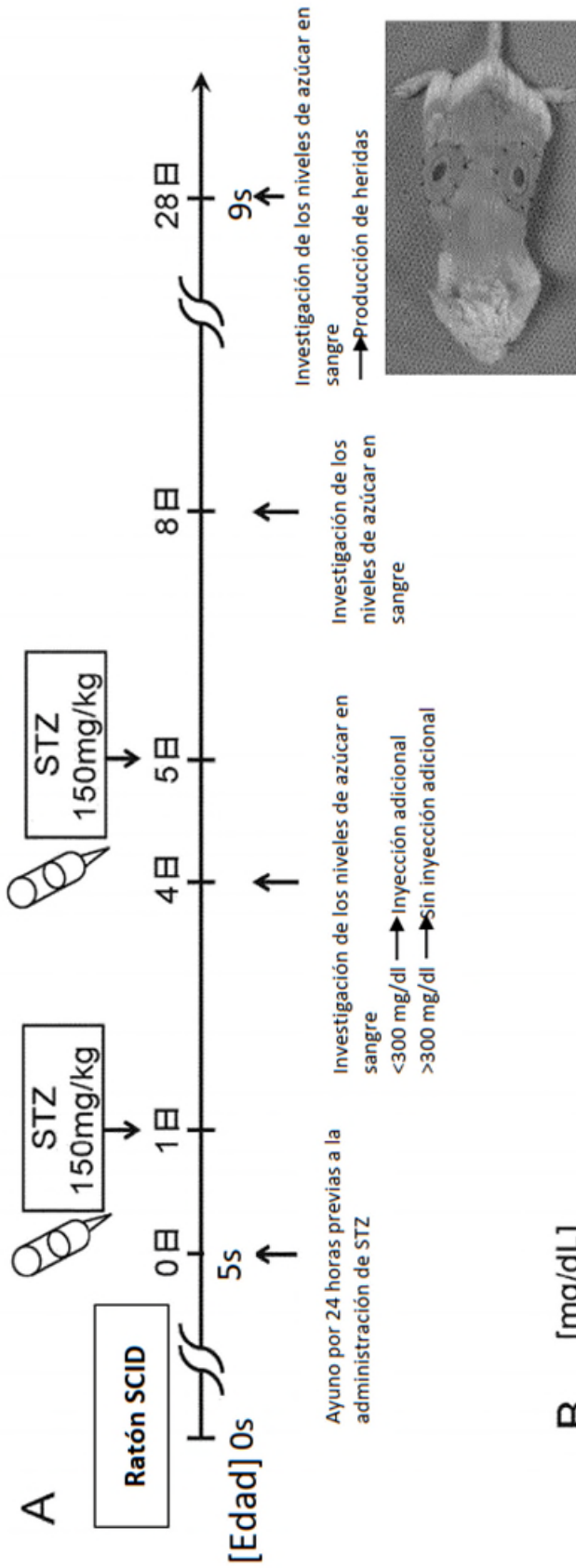


FIGURA 2

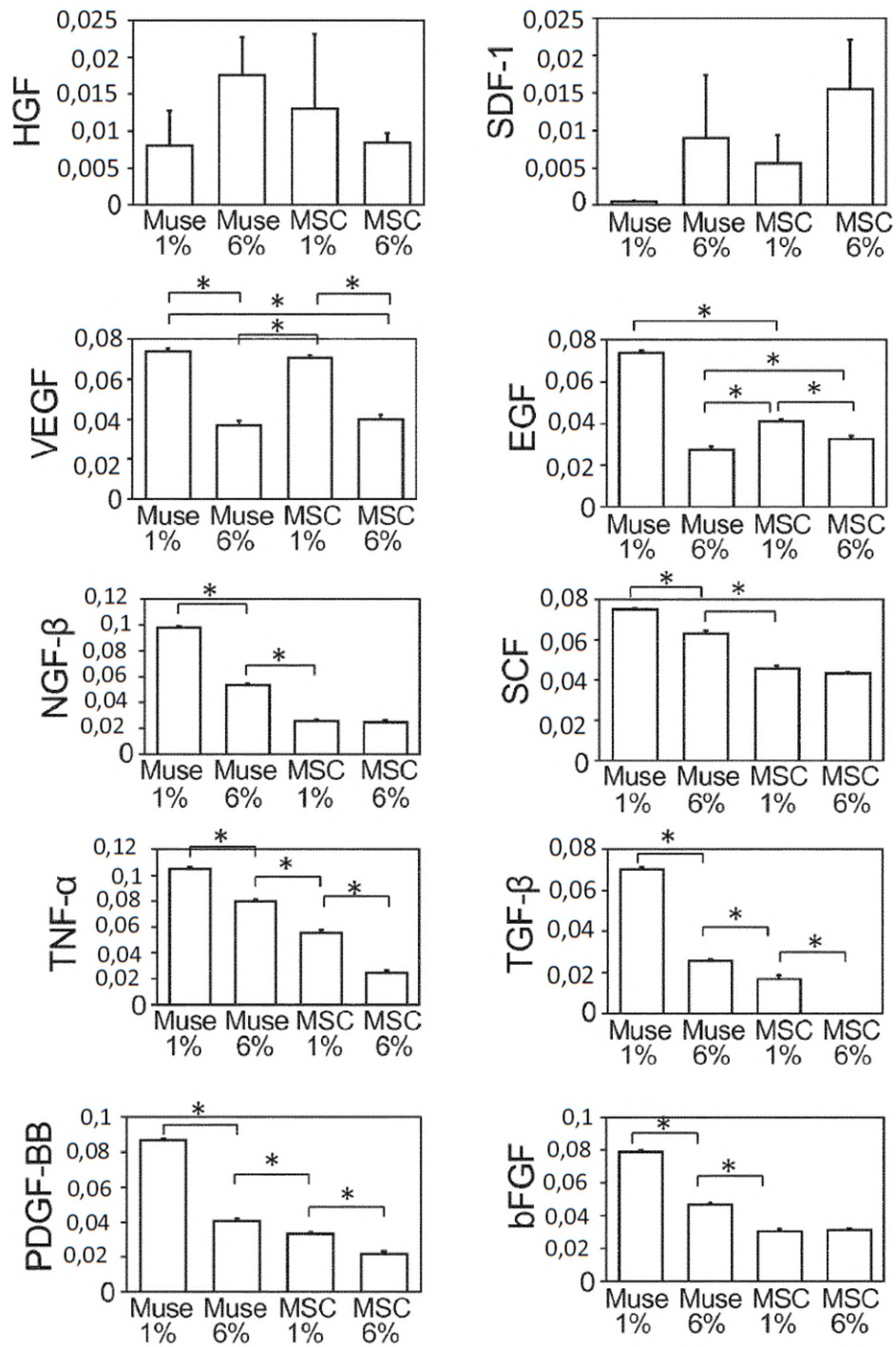


FIGURA 3

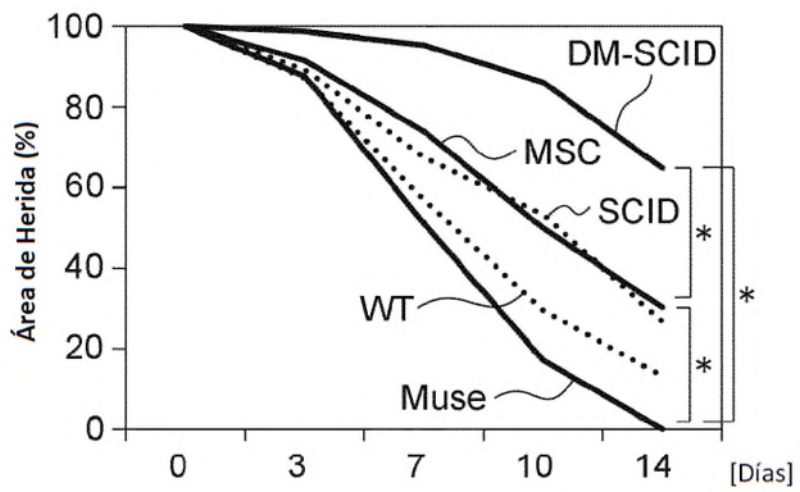
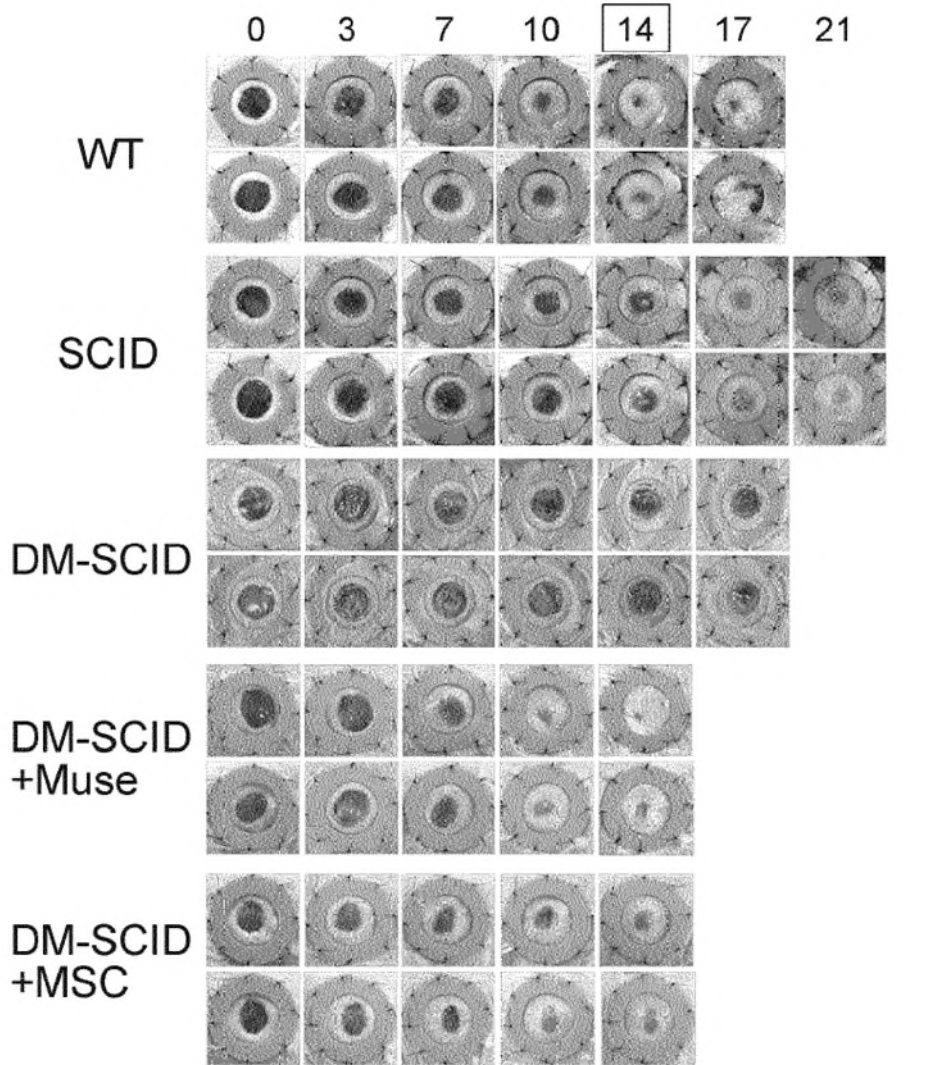


FIGURA 4

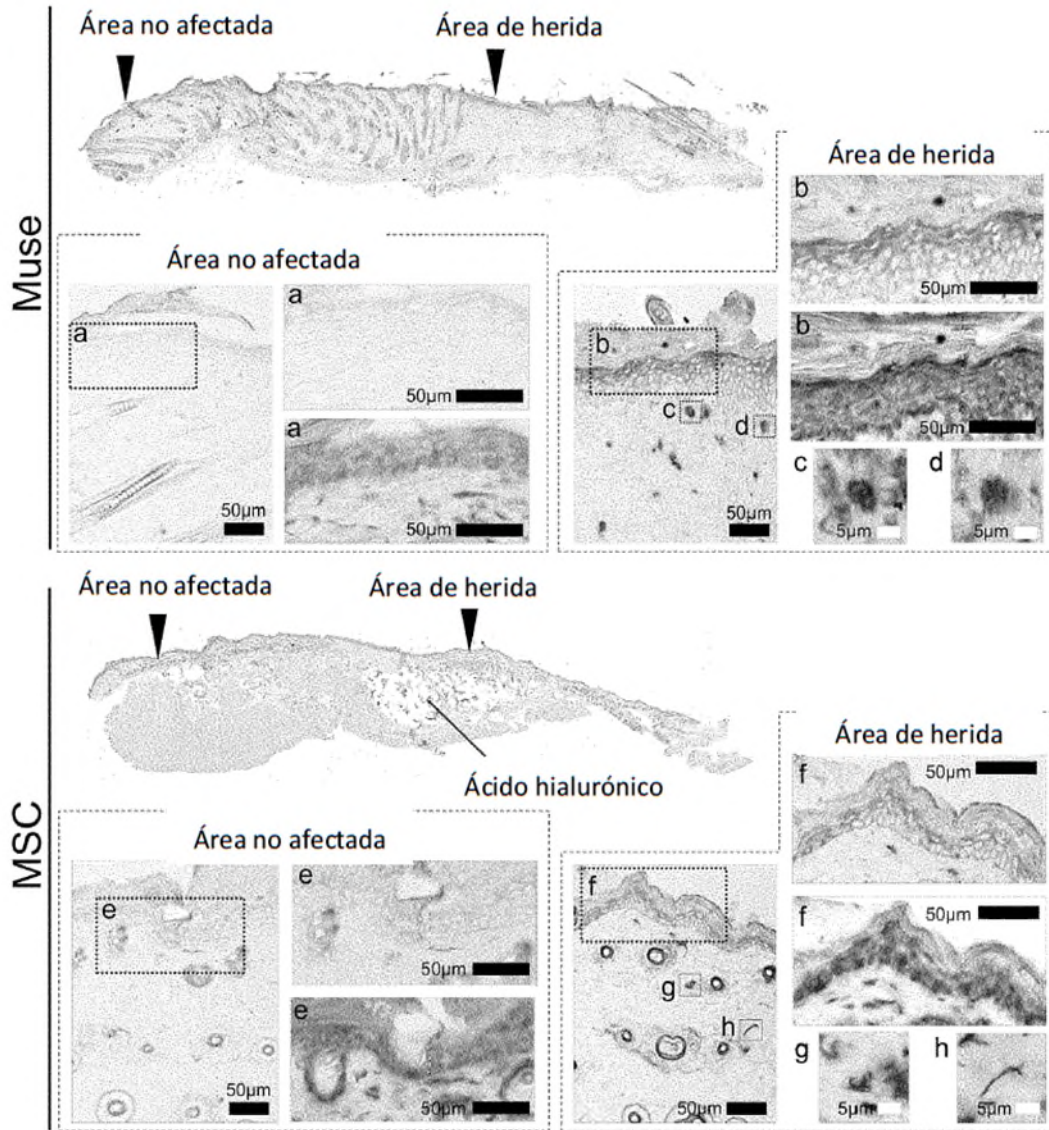
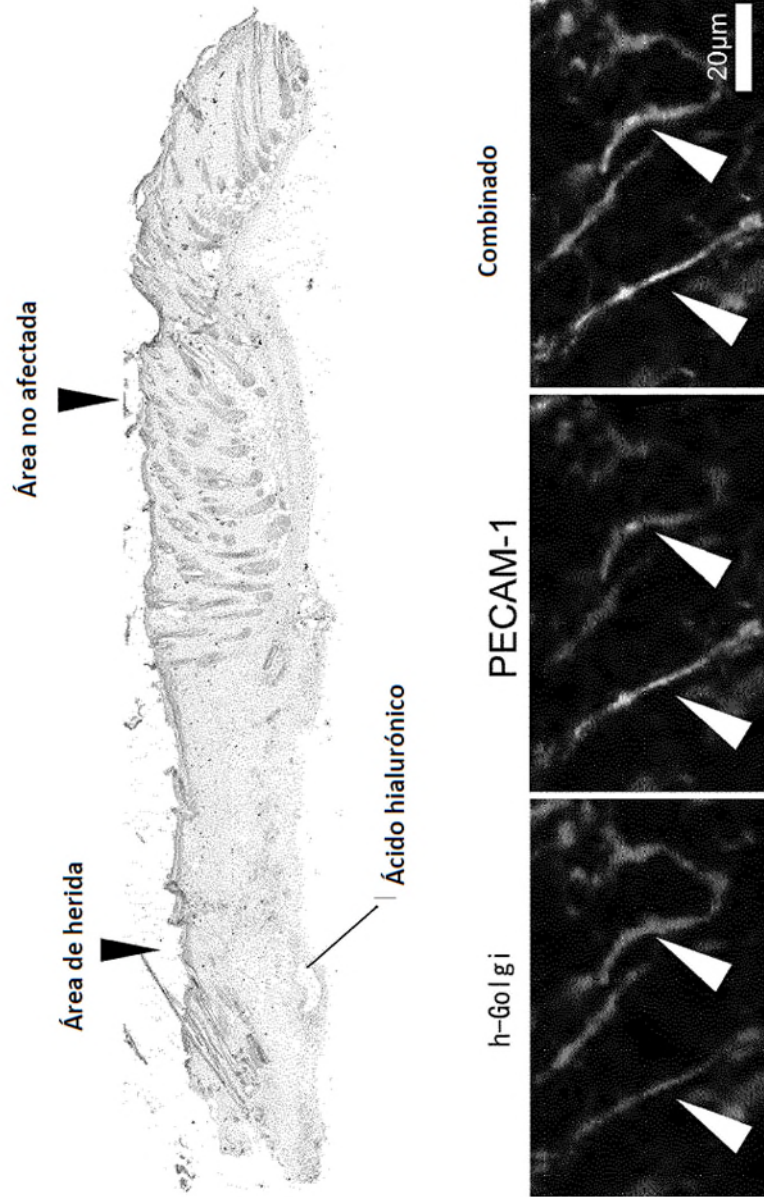


FIGURA 5



Capa dérmica superior