

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 009 590**

51 Int. Cl.:

A61L 15/40	(2006.01)
A61K 35/28	(2015.01)
A61L 27/38	(2006.01)
A61L 27/52	(2006.01)
A61L 27/60	(2006.01)
C12N 5/095	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2014 PCT/KR2014/006068**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15105249**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2014 E 14877608 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2025 EP 3092989**

54 Título: **Composición de soporte de células madre mesenquimatosas en hidrogel biodegradable o de células madre mesenquimatosas en hidrogel no degradable para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas**

30 Prioridad:

10.01.2014 KR 20140003499
30.05.2014 KR 20140065816

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.03.2025

73 Titular/es:

ANTEROGEN CO., LTD. (100.00%)
405 NamsungPlaza (Gasam-dong) 130 Digital-ro
Geumcheon-gu, Seoul 153-782, KR

72 Inventor/es:

LEE, SUNG-KOO;
KIM, MIHYUNG y
KIM, INOK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 3 009 590 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de soporte de células madre mesenquimatosas en hidrogel biodegradable o de células madre mesenquimatosas en hidrogel no degradable para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a una composición que comprende un soporte de células madre mesenquimatosas en hidrogel no degradable para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, una lámina que comprende la composición y un método para la preparación de la misma. Especialmente, la composición de tipo lámina que comprende las células madre de acuerdo con la presente invención puede usarse como apósito para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas.

[Antecedentes de la técnica]

La diabetes es un estado en el que el nivel de glucosa en sangre (glucemia) es superior al del estado normal, lo que está causado por el uso inadecuado de los alimentos ingeridos. La herida diabética, denominada también pie diabético o úlcera del pie diabético, es la principal complicación en los pacientes diabéticos, y se desarrolla a partir de la insensibilidad causada por la muerte de las células neuronales debido al alto nivel de glucosa en sangre y a la mala circulación sanguínea en las condiciones diabéticas.

La cicatrización normal de las heridas es una serie de procesos que requieren la eliminación de los tejidos dañados y del patógeno invasor, seguida de la reorganización de los tejidos dañados, que pasa por los siguientes procesos: (1) proceso inflamatorio en el que las células inflamatorias, tales como los glóbulos blancos, etc. recogen y eliminan el patógeno invasor y los tejidos muertos, etc.; (2) proceso de proliferación en el que las células epiteliales que rodean la herida migran y proliferan por la estimulación de los factores de crecimiento secretados por los glóbulos blancos para cubrir la zona dañada, y los fibrocitos de la dermis acumulan colágeno para regenerar los vasos sanguíneos capilares, dando como resultado la epitelización de la porción acanalada; y (3) proceso de maduración en el que las células inflamatorias desaparecen y los tejidos de granulación formados temporalmente maduran hasta convertirse en tejidos cutáneos similares a las texturas originales. Dichos procesos de restauración transcurren por la acción de diferentes factores de crecimiento y citocinas, por ejemplo, factor de crecimiento insulinoide (IGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y a través de la interacción de los diferentes tipos de células, tales como células inflamatorias, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, etc.

Una herida normal puede curarse fácilmente mediante la progresión sucesiva de los procesos de cicatrización de heridas mencionados. La regeneración de la piel o la cicatrización de heridas se lleva a cabo a través de varios procesos de inflamación, reepitelización, granulación, fibroplasia, contracción de los tejidos heridos, etc. (Freedberg *et al.*, J. Clin. Psychol., 57: 433-455, 2001). Los procesos de regeneración de la piel se llevan a cabo mediante la cooperación de diferentes células, tales como queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, plaquetas, etc., y los complejos avances que incluyen la migración, infiltración, proliferación y diferenciación de dichas células, están regulados por diferentes factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas, por lo que la eficacia de los factores biológicos o químicos es bien conocida.

Sin embargo, la comercialización de la técnica de cicatrización de heridas mediante factores de crecimiento y citocinas tiene algunas dificultades, ya que la producción y el aislamiento de las proteínas son procesos muy costosos. Además, las proteínas actúan de forma compleja en los procesos de cicatrización de heridas, de modo que el uso de un único tipo de proteína da como resultado un alivio parcial de la herida y respuestas insatisfactorias, lo que alarga el periodo terapéutico y hace que el tratamiento sea ineficaz.

En el caso de heridas crónicas de pacientes diabéticos, debido a una reducción en la producción de factores de crecimiento, reducción de la angiogénesis y degeneración de la migración y proliferación de queratinocitos y fibroblastos, etc., los procesos de cicatrización de heridas no transcurren sucesivamente, sino que permanecen en proceso inflamatorio, y la regeneración es difícil (*Eur J Cell Biol* 81: 153-60, 2002; *Br J Surg* 90: 133-46, 2003).

A la luz de la situación anterior, se ha desarrollado un injerto de piel en heridas diabéticas utilizando piel cultivada y piel artificial compuesta de fibroblastos y/o células epidérmicas que componen la piel.

Un estudio reciente de las células madre reveló que las células madre pueden diferenciarse en células cutáneas y segregar una gran cantidad de diferentes factores de crecimiento, ya que son muy activas en comparación con las células cutáneas, y también pueden modular las respuestas inmunitarias. En consecuencia, se ha probado la técnica de cicatrización de heridas diabéticas injertando células madre en la zona herida de un ratón diabético (*J Diabetes Res.* 2013; 2013: 647107, Diabetes. julio de 2013; 62 (7): 2588-94, *Plast Reconstr Surg.* octubre de 2011; 128 (4): 872-80.). Maharlooei MK *et al.* (Diabetes Res Clin Pract. agosto de 2011; 93 (2): 228-34) demostraron que las células

madre adultas aisladas de tejidos adiposos tienen una mayor actividad de cicatrización de heridas en el ratón diabético. Además, se ha notificado que las células madre derivadas de tejido adiposo se extrajeron de tejidos adiposos obtenidos de la región abdominal de pacientes con úlcera de pie diabético mediante liposucción y, a continuación, se aplicaron a las zonas heridas sin ser cultivadas, que da como resultado la cicatrización completa de la zona herida de todos los pacientes en 8 semanas.

Sin embargo, el método tiene el defecto de que deben recogerse los propios tejidos de los pacientes, ya que las células no cultivadas incluyen células inmunitarias, lo cual es bastante inconveniente e incluso peligroso, ya que las heridas producidas en pacientes diabéticos no cicatrizan fácilmente y la liposucción puede causar otra herida crónica. El subcultivo de células aisladas de tejidos adiposos elimina las células inmunitarias y mantiene las células madre mesenquimatosas, que no tienen inmunogenicidad, suprimen la respuesta inmunitaria excesiva, secretan diferentes factores de crecimiento y pueden utilizarse en trasplantes autólogos y alogénicos. Dichas células cultivadas se han aislado y aplicado a enfermedades, lo que se denomina la primera generación de productos para terapia con células madre.

Los productos convencionales para terapia con células madre de primera generación son células aisladas obtenidas mediante el tratamiento de proteasas tales como tripsina o dispasa. Dado que la proteasa digiere todas las proteínas expuestas en la membrana celular de forma no selectiva, las conexiones intercelulares y las proteínas de la membrana basal raramente se mantienen tras el tratamiento de la proteasa. Además, las células madre mesenquimatosas, que son células muy adherentes, mueren en las 6-24 horas siguientes a su aislamiento y tienen una compatibilidad celular muy baja.

La patente coreana n.º 1.101.321 divulga un vehículo de administración de células de tipo hidrogel para la cicatrización de heridas. La composición del vehículo de administración de células es de tipo hidrogel en el que se dispersa un tensioactivo no iónico de polipropilenglicol-polietilenglicol condensado, sin gelificante, en un medio acuoso seleccionado del grupo que consiste en solución salina, solución amortiguadora de fosfato (PBS) y medio de cultivo celular a una concentración del 15-50 % en peso. El documento de patente describe el efecto de favorecer la cicatrización de heridas resultante de humedecerla e impedir su contracción, sin mencionar el efecto de cicatrización de heridas por el mecanismo de fomentar la secreción de factores de crecimiento o aumentar el nivel de sustancias intercelulares. Además, no divulga el uso de soportes biodegradables ni de soportes no degradables. El hidrogel tiene diferentes tamaños de estructura de red, diferente dureza y tasas de descomposición diferentes en función de las concentraciones de fabricación, lo que afecta a los tipos y tasas de proliferación de las células incluidas en el mismo. El documento de patente no menciona las condiciones óptimas del hidrogel para las células madre mesenquimatosas.

Teniendo en cuenta los problemas anteriores, los presentes inventores han concebido una composición y una lámina para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas que comprende células madre mesenquimatosas vivas muy activas que se cultivan después de ser dispersadas en hidrogel y fijadas a soportes biodegradables o no degradables, y un método para la preparación de las mismas. La mayoría de las células madre mesenquimatosas incluidas en la lámina preparada mediante dicho método expresan CD73 y CD90, y como máximo el 70 % de las células madre expresan CD105.

[Técnicas anteriores]

Patente coreana n.º 1.293.762,
 Patente coreana n.º 1.106.015,
 Patente coreana n.º 1.328.604,
 Patente coreana n.º 1.101.321,
 Patente coreana n.º 1.335.176
 Publicación de patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2010-0114729,
 Documento WO2013/022447,
 Documento WO2008/060374,
 J Diabetes Res. 2013; 2013: 647107,
 Diabetes. julio de 2013; 62 (7): 2588-94,
 Plast. Reconstr. Surg. octubre de 2011; 128 (4): 872-80.
 Maharlooeei MK, *et al.*, Diabetes Res. Clin. Pract. agosto de 2011; 93 (2): 228-34.;
 Tissue eng. (4): 1403~414, 1988

[Problemas a resolver]

La presente invención está dirigida al uso de células madre mesenquimatosas aisladas a partir de tejidos adiposos humanos en la regeneración de la piel y la cicatrización de heridas, y el objeto de la presente invención es proporcionar una composición o una lámina para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas que comprende células madre mesenquimatosas de tejido adiposo para lograr efectos terapéuticos clínicamente eficaces, y un método para la preparación de las mismas.

[Medios técnicos]

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición que comprende un soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en hidrogel no degradable, una lámina que comprende la composición y un método para la preparación de la misma.

La presente invención se refiere a un método para preparar una lámina para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, que comprende las siguientes etapas: (a) aislar células madre mesenquimatosas a partir de tejido adiposo y cultivar las células madre en un medio de expansión durante al menos dos pases; (b) combinar las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo cultivadas con un soporte no degradable mediante un hidrogel para obtener un soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en hidrogel; y (c) cultivar el soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en hidrogel obtenido en la etapa (b) en un medio de expansión. El medio de expansión de la etapa (a) o (c) comprende al menos un factor seleccionado del grupo que consiste en FBS (suero bovino fetal), bFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β -1), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) e IFG-1 (factor de crecimiento insulinoide). El hidrogel es un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en pegamento de fibrina, ácido hialurónico, gelatina, ácido algínico, celulosa y pectina; y el soporte no degradable se selecciona entre una fibra de tejido no tejido esterilizada, película de PET (tereftalato de polietileno), película de PE (polietileno), película de PP (polipropileno) o combinaciones de las mismas.

La presente invención también se refiere a una composición para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, que comprende células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo, un hidrogel y un soporte no degradable, en donde el hidrogel incluye factores de crecimiento que fomentan el crecimiento celular y la angiogénesis, y una matriz extracelular secretada por las células madre mesenquimatosas cuando las células madre mesenquimatosas, el hidrogel y el soporte se cultivan en un medio de expansión. El hidrogel es un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en pegamento de fibrina, ácido hialurónico, gelatina, ácido algínico, celulosa y pectina; y el soporte no degradable se selecciona entre una fibra de tejido no tejido esterilizada, película de PET (tereftalato de polietileno), película de PE (polietileno), película de PP (polipropileno) o combinaciones de las mismas.

La presente invención también se refiere a una lámina para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, que comprende la composición de la presente invención como componente activo.

En la composición para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas de acuerdo con la presente invención, las células madre mesenquimatosas son células autólogas o alogénicas positivas para CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, mientras que son negativas para CD34 y CD45.

De acuerdo con la presente invención, el soporte no degradable se selecciona entre una fibra de tejido no tejido esterilizada, película de PET (tereftalato de polietileno), película de PE (polietileno) y película de PP (polipropileno), o una combinación de las mismas.

De acuerdo con la presente invención, el hidrogel es un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en pegamento de fibrina, ácido hialurónico o sus derivados, gelatina, colágeno, ácido algínico, celulosa y pectina. De acuerdo con una realización, la concentración del fibrinógeno que compone el pegamento de fibrina es de 0,5 a 30 mg/ml, más preferentemente, de 0,5 a 20 mg/ml, aún más preferentemente, de 0,5 a 10 mg/ml.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el método para preparar la lámina para la regeneración de la piel y la cicatrización de heridas comprende las etapas de aplicar una mezcla de las células madre y el hidrogel al soporte en una cantidad de 4000 a 6000 células por cm^2 de soporte y cultivar el soporte en un medio de expansión que comprende FBS y bFGF o EGF hasta que el número de células madre sea de al menos 20 000 células, más preferentemente, de 20 000 a 200 000 células por cm^2 de soporte.

[Efecto de la invención]

De acuerdo con la composición o la lámina que comprende las células madre mesenquimatosas de la presente invención, las células madre de alta actividad pueden aplicarse directamente sobre la herida sin un proceso de aislamiento (selección) con proteasa. La composición o la lámina tiene matrices extracelulares tales como colágeno, laminina, fibronectina y elastina secretadas por las células madre en la fase de cultivo e incluidas por completo en el hidrogel, por lo que tiene unos efectos superiores de regeneración cutánea y cicatrización de heridas en comparación con los preparados farmacéuticos convencionales, y acorta el periodo terapéutico.

Más específicamente, el soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en hidrogel de acuerdo con la presente invención mantiene la forma de fibroblasto en medio sin suero, y al menos el 90 % de las células sobreviven tras un lapso de una semana, lo que supone un inesperado aumento del tiempo de supervivencia en comparación con los productos convencionales de terapia con células madre. Al descongelarse tras la criopreservación, la lámina mantiene su forma y resistencia iniciales y sobreviven al menos el 95 % de las células, lo que permite criopreservar la lámina a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ durante un largo periodo sin dañar las células. Dado que en el hidrogel

se secretan continuamente diferentes factores de crecimiento y citocinas que fomentan el crecimiento celular y la angiogénesis, y se secretan y mantienen muchas matrices extracelulares, el soporte de células madre mesenquimatosas en hidrogel de la presente invención proporciona diferentes matrices extracelulares tras su trasplante al cuerpo para facilitar la cicatrización de heridas. Además, el soporte de células madre mesenquimatosas en hidrogel de la presente invención no induce una respuesta inmunitaria, sino que alivia la inflamación reduciendo notablemente la secreción de TNF-alfa, que es secretado por los inmunocitos y aumenta la inmunorreactividad, y por lo tanto ayuda a la cicatrización de las heridas.

[Breve descripción de los dibujos]

La FIG. 1a son fotografías (x400) de un microscopio de fluorescencia que muestran las formas de células madre mesenquimatosas humanas derivadas de tejido adiposo que se cultivan con gel de fibrina hecho a partir de solución madre de fibrinógeno o diluciones escalonadas de la misma, y a continuación se tiñen con AO/EtBr. La tasa de dilución del fibrinógeno y su concentración en el pegamento de fibrina formado a partir de una mezcla 1:1 con una suspensión celular que contiene trombina se indican entre paréntesis.

La FIG. 1b es un gráfico que muestra la absorbancia medida en células madre mesenquimatosas humanas derivadas de tejido adiposo que se cultivan con gel de fibrina preparado a partir de una solución madre de fibrinógeno o de diluciones escalonadas de la misma, y a continuación se les añade WST-1.

La FIG. 2a son fotografías que muestran la lámina de soporte con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano en hidrogel biodegradable o no degradable.

La FIG. 2b son fotografías que muestran las células de la lámina de la FIG. 2a, en las que "a" y "b" son fotografías de un microscopio óptico que muestran la lámina inmediatamente después de la preparación (Día 0) y después de ser cultivada durante 5 días, respectivamente; y "c" es una fotografía de un microscopio de fluorescencia que muestra la lámina después de haber sido cultivada durante 5 días y teñida con AO/EtBr.

La FIG. 2c es un gráfico que muestra la tasa de supervivencia de las células en la lámina de la FIG. 2a a lo largo del tiempo.

La FIG. 3a es una fotografía que muestra el soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano en hidrogel biodegradable o no degradable, descongelado tras su crioconservación a -80 °C.

La FIG. 3b son fotografías de un microscopio de fluorescencia que muestran las células de la lámina de la FIG. 3a después de ser teñidas con AO/EtBr, en las que "a" muestra las células madre mesenquimatosas adheridas al soporte biodegradable o al soporte de fibra no degradable; y "b" muestra las células madre mesenquimatosas adheridas al soporte de película no degradable.

La FIG. 4 muestra los resultados obtenidos a partir de una célula de un único tipo que se separa de la lámina del soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano en hidrogel biodegradable o no degradable y a continuación se mide con un citómetro de flujo tras teñirla con proteínas de la superficie celular. En comparación con el resultado obtenido con las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo subcultivadas mediante el método descrito en la técnica anterior, las expresiones de CD29, CD44, CD73 y CD90 muestran unos resultados similares, mientras que la expresión de CD105 disminuye hasta el 70 % o menos.

La FIG. 5a son gráficos que muestran las cantidades de VEGF y HGF, analizadas cuantitativamente mediante el método ELISA, que son secretados por la lámina de soporte con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano en hidrogel biodegradable o no degradable.

La FIG. 5b muestra los resultados medidos en el kit de matriz de citocinas para los factores estimulantes de la angiogénesis secretados por la lámina de soporte con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano en hidrogel biodegradable o no degradable.

La FIG. 6 son fotografías que muestran la lámina de soporte con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano en hidrogel biodegradable o la lámina de soporte no degradable que se someten a una tinción de fluorescencia con proteínas de la matriz extracelular.

La FIG. 7a es un gráfico que muestra las cantidades de TNF- α , analizadas cuantitativamente mediante el método ELISA, que son secretadas por monomorfonucleares periféricos tras el cultivo conjunto de la lámina de soporte con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano en hidrogel biodegradable o la lámina de soporte no degradable y los monomorfonucleares periféricos alogénicos.

La FIG. 7b es un gráfico que muestra la tasa de supresión (%) de la secreción de TNF- α , que se obtiene tras analizar cuantitativamente mediante el método ELISA la cantidad de TNF- α secretada por los monomorfonucleares periféricos tras el cultivo conjunto de la lámina de soporte con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo

humano en hidrogel biodegradable o la lámina de soporte no degradable y monomorfonucleares periféricos alogénicas activados, y a continuación convertir la cantidad en la tasa de supresión.

5 La FIG. 8a es un gráfico que muestra los resultados obtenidos en modelos de heridas diabéticas tratadas con la lámina de soporte con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano en hidrogel biodegradable o la lámina de soporte no degradable, vehículo, hidrogel y célula madre de un único tipo. En el gráfico, el eje y indica un porcentaje (%) sobre la superficie inicial de la herida, y el eje x indica los días transcurridos tras el tratamiento.

10 La FIG. 8b son fotografías que muestran los resultados obtenidos en modelos de heridas diabéticas tratados con la lámina de soporte con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano en hidrogel biodegradable o la lámina de soporte no degradable, vehículo, hidrogel y célula madre de un único tipo.

[Mejor modo de llevar a cabo la invención]

15 Con el fin de alcanzar el objetivo descrito anteriormente, la presente invención proporciona una composición para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, que comprende células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo, un hidrogel y un soporte no degradable, una lámina que comprende la composición y un método para la preparación de la misma.

20 La presente invención se refiere a un método para preparar una lámina para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, que comprende las siguientes etapas:

25 (a) aislar células madre mesenquimatosas a partir de tejido adiposo y cultivar las células madre en un medio de expansión durante al menos dos pases;

(b) combinar las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo cultivadas con un soporte no degradable mediante un hidrogel para obtener un soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en hidrogel; y

30 (c) cultivar el soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en hidrogel obtenido en la etapa (b) en un medio de expansión,

35 en donde el medio de expansión de la etapa (a) o (c) comprende al menos un factor seleccionado del grupo que consiste en FBS (suero bovino fetal), bFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β -1), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) e IGF-1 (factor de crecimiento insulinoide);

40 en donde el hidrogel es un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en pegamento de fibrina, ácido hialurónico, gelatina, ácido algínico, celulosa y pectina; y

en donde el soporte no degradable se selecciona entre una fibra de tejido no tejido esterilizada, película de PET (tereftalato de polietileno), película de PE (polietileno), película de PP (polipropileno) o combinaciones de las mismas.

45 De acuerdo con una realización de la presente invención, el factor incluido en el medio de expansión puede ser más específicamente bFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), o combinaciones de los mismos.

50 De acuerdo con una realización de la presente invención, las células madre mesenquimatosas son células autólogas o alogénicas positivas para CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, mientras que son negativas para CD34 y CD45.

55 De acuerdo con una realización de la presente invención, el método para preparar la lámina para la cicatrización de heridas comprende las etapas de aplicar una mezcla de las células madre y el hidrogel al soporte en una cantidad de 4000 a 6000 células por cm² de soporte, y cultivar el soporte en un medio de expansión que comprende al menos uno seleccionado de un grupo que comprende FBS, bFGF y EGF hasta que el número de células madre sea de al menos 20 000 células, más preferentemente, de 20 000 a 200 000 células por cm² de soporte.

60 De acuerdo con una realización de la presente invención, el método puede comprender además la etapa (d) de activar las células de la etapa (c) proporcionando al menos un estímulo seleccionado del grupo que comprende un estímulo físico, un estímulo hipóxico, un estímulo mitógeno y un factor de estímulo inflamatorio, por ejemplo, estímulo IFN- γ . En los tejidos dañados por heridas diabéticas, el suministro de oxígeno no es fácil debido a que los vasos sanguíneos están dañados o deteriorados y existe una inflamación crónica, y las células madre aplicadas a los tejidos dañados se activan por el estrés hipóxico y los factores inflamatorios, por lo que la secreción de factores de crecimiento y citocinas aumenta bruscamente. De acuerdo con la presente invención, la composición y la lámina que comprende células madre muy activas pueden prepararse proporcionando un estímulo hipóxico, mitógeno o factores inflamatorios en el proceso de fabricación de la lámina de soporte.

De acuerdo con la presente invención, el hidrogel es un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en pegamento de fibrina, ácido hialurónico, gelatina, ácido algínico, celulosa o pectina. Cuando se utiliza pegamento de fibrina como hidrogel, puede comprender fibrinógeno a una concentración de 0,5 a 30 mg/ml, preferentemente, de 0,5 a 20 mg/ml, más preferentemente, de 0,5 a 10 mg/ml, aún más preferentemente, de 0,5 a 5 mg/ml. El pegamento de fibrina puede comprender trombina a una concentración de 1 a 50 U.I./ml, preferentemente, de 1 a 30 U.I./ml, más preferentemente, de 5 a 20 U.I./ml.

La resistencia de la lámina de hidrogel de células madre mesenquimatosas se perfecciona utilizando un soporte no degradable, y la lámina reforzada puede usarse con más comodidad.

De acuerdo con la presente invención, el soporte no degradable se selecciona entre una fibra de tejido no tejido esterilizada, película de PET (tereftalato de polietileno), película de PE (polietileno), película de PP (polipropileno) o combinaciones de las mismas.

De acuerdo con una realización de la presente invención, puede usarse una combinación de al menos un soporte biodegradable y al menos un soporte no degradable. Algunos ejemplos de la combinación son PGA (ácido poli-gamma-glutámico)/fibra de tejido no tejido, PLA (ácido poliláctico)/fibra de tejido no tejido o PGA/PLA/fibra de tejido no tejido.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las heridas pueden ser heridas diabéticas.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el método puede comprender además la etapa (e) crioconservar el soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo de la etapa (c) en un agente crioconservante que comprende del 1 al 20 % p/v de DMSO y del 1 al 50 % p/v de seroalbúmina humana, en donde la tasa de supervivencia de las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo es del 90 % o superior tras su descongelación.

La presente invención también proporciona una composición para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, que comprende células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo, un hidrogel y un soporte no degradable; en donde el hidrogel incluye factores de crecimiento que fomentan el crecimiento celular y la angiogénesis, y una matriz extracelular secretada por las células madre mesenquimatosas cuando las células madre mesenquimatosas, el hidrogel y el soporte se cultivan en un medio de expansión.

El hidrogel es un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en pegamento de fibrina, ácido hialurónico, gelatina, ácido algínico, celulosa y pectina. Cuando se utiliza pegamento de fibrina como hidrogel, puede comprender fibrinógeno a una concentración de 0,5 a 30 mg/ml, preferentemente, de 0,5 a 20 mg/ml, más preferentemente, de 0,5 a 10 mg/ml, aún más preferentemente, de 0,5 a 5 mg/ml. El pegamento de fibrina puede comprender trombina a una concentración de 1 a 50 U.I./ml, preferentemente, de 1 a 30 U.I./ml, más preferentemente, de 5 a 20 U.I./ml.

El soporte no degradable se selecciona entre una fibra de tejido no tejido esterilizada, película de PET (tereftalato de polietileno), película de PE (polietileno), película de PP (polipropileno) o combinaciones de las mismas.

En la composición de acuerdo con la presente invención, puede usarse una combinación de al menos un soporte biodegradable y al menos un soporte no degradable. Algunos ejemplos de la combinación son PGA/fibra de tejido no tejido, PLA/fibra de tejido no tejido o PGA/PLA/fibra de tejido no tejido.

En la composición de acuerdo con la presente invención, las heridas pueden ser heridas diabéticas.

La presente invención también proporciona una lámina para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, que comprende la composición anterior como componente activo.

[EXPLICACIÓN CONCRETA PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION]

De acuerdo con una realización de la presente invención, el método comprende más específicamente las siguientes etapas:

(a) aislar células madre mesenquimatosas a partir de tejido adiposo y cultivar las células madre en un medio de expansión que comprende FBS (suero bovino fetal), bFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos) o EGF (factor de crecimiento epidérmico) durante al menos dos pases;

(b) combinar las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo cultivadas con un soporte no degradable mediante un hidrogel para obtener un soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en hidrogel;

(c) cultivar el soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en hidrogel obtenido en la etapa (b) en un medio de expansión que comprenda FBS, bFGF o EGF durante aproximadamente 5 días para preparar una

lámina;

(d) activar las células de la etapa (c) mediante un estímulo físico, un estímulo hipóxico, un estímulo mitógeno o un estímulo de factor inflamatorio;

(e) lavar la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo obtenida en la etapa (c) o (d) con un medio sin FBS, bFGF o EGF;

(f) crioconservar la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas de la etapa (c) en un agente crioconservante que comprende un 10 % de DMSO y un 5 % de seroalbúmina humana;

(g) descongelar la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas crioconservada y lavarla con solución salina para eliminar el agente crioconservante;

(h) aplicar la lámina cortada al tamaño de una herida en una zona de herida diabética; y

(i) aplicar la lámina.

En lo sucesivo en el presente documento, se explica el método con más detalle.

En la etapa (a), las células madre mesenquimatosas se aíslan a partir de tejido adiposo y se cultivan en un medio de expansión durante al menos dos pases de acuerdo con el método descrito en la patente coreana n.º 1.328.604. Al usar el medio de expansión, se puede obtener eficazmente una gran cantidad de células madre mesenquimatosas en poco tiempo. Las células madre mesenquimatosas obtenidas mediante cultivo durante al menos dos pases de acuerdo con la técnica anterior se adhieren a un recipiente de cultivo de plástico para mantener la forma de fibroblasto, y son positivas para CD10, C13, CD29, CD44, CD59, CD71, CD90, CD105 e Oct4, mientras que son negativas para CD34, CD45, CD104, CD106 y Stro-1. Las células madre muestran multipotencia para diferenciarse en adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos, células nerviosas, etc. *in vitro*. También secretan diferentes factores de crecimiento tales como VEGF, HGF, TGF-β1, NGF e IGF, y tienen actividad inmunomoduladora. En consecuencia, se han desarrollado nuevas técnicas de aplicación de células madre para tratar diferentes enfermedades.

En la etapa (b), las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo obtenidas mediante cultivo durante al menos dos pases en la etapa (a) se tratan con tripsina o dispasa para obtener células de tipo único, que a continuación se dispersan en hidrogel. La mezcla de células madre e hidrogel se aplica uniformemente en un soporte no degradable en una cantidad de aproximadamente 5000 células/cm² para que se adhieran al mismo. El soporte se cultiva en un medio de expansión que comprende FBS y bFGF o EGF durante aproximadamente de 3 a 5 días. Aunque el gel de fibrina se usa como hidrogel en los ejemplos de la presente invención, también pueden usarse ácido hialurónico, gelatina, ácido algínico, celulosa y pectina.

Asimismo, aunque se utiliza una gasa esterilizada o una película de PET como soporte no degradable, también puede usarse PGA/fibra de tejido no tejido o PGA/PLA/fibra de tejido no tejido.

En la presente invención, el hidrogel sirve en primer lugar para fijar las células madre mesenquimatosas a soportes no degradables, tales como película de PET, lámina de PE y lámina de PP. En segundo lugar, proporciona sustratos para las células madre mesenquimatosas adherentes, para que las células adheridas al mismo puedan sobrevivir de forma estable. El hidrogel tiene mucha estructura de red tridimensional (poro) y, por tanto, el FBS, el bFGF o el EGF contenido en el medio pasa a través de la estructura de poros para actuar sobre las células. Asimismo, el hidrogel tiene diferentes tamaños de estructura de red, dureza e índices de descomposición en función de las concentraciones de fabricación, lo que afecta a los tipos y tasas de proliferación de las células incluidas en el mismo. En los ejemplos de la presente invención, se utiliza gel de fibrina a una concentración final de 0,5 a 10 mg/ml para aumentar la tasa de proliferación de las células madre mesenquimatosas y mantener una resistencia adecuada del gel.

En la etapa (c), las células madre mesenquimatosas proliferan rápidamente en la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas para multiplicarse por cuatro o más durante 3 a 5 días, y por tanto el número de células madre llega a ser de al menos 20 000 células por cm² de soporte.

De acuerdo con una realización de la presente invención, las células proliferadas en el hidrogel expresan CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105, lo que es característico de las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo, y secretan diferentes factores de crecimiento, incluidos VEGF y HGF. Además, las células tienen actividades supresoras del TNF-α y del IFN-γ, que son factores inflamatorios representativos secretados en las células inmunitarias. Es decir, las células cultivadas en el hidrogel mantienen la característica de células madre mesenquimatosas.

En la etapa (c), puede realizarse adicionalmente un tratamiento con estrés hipóxico, tratamiento mitógeno o factor inflamatorio, por ejemplo, IFN-γ. En los tejidos dañados por heridas diabéticas, el suministro de oxígeno no es fácil debido a que los vasos sanguíneos están dañados o deteriorados y existe una inflamación crónica, y las células madre aplicadas a los tejidos dañados se activan por el estrés hipóxico y los factores inflamatorios, por lo que la secreción

de factores de crecimiento y citocinas aumenta bruscamente.

Como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con una realización de la presente invención, el método para preparar una lámina comprende células madre muy activas proporcionando estrés hipóxico, un mitógeno o un factor inflamatorio en el proceso de fabricación de la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo.

La lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo preparada de acuerdo con la presente invención tiene una capacidad de cicatrización superior, porque las células madre de alta actividad pueden aplicarse directamente sobre la herida sin un proceso de aislamiento con proteasa. Asimismo, la lámina tiene matrices extracelulares tales como colágeno, laminina, fibronectina y elastina secretadas por las células madre mesenquimatosas en la fase de cultivo e incluidas por completo en el hidrogel, por lo que puede favorecer la cicatrización de heridas.

La resistencia de la lámina de hidrogel de células madre mesenquimatosas se perfecciona utilizando un soporte no degradable, y la lámina reforzada puede usarse con más comodidad. La lámina tiene un espesor de 0,1~2 mm, lo que impide que la lámina se desgarre cuando se aplica a las heridas, y permite que se incluyan en la misma suficientes células para potenciar los efectos curativos.

En la etapa (e), la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo puede lavarse con solución salina dos o tres veces para eliminar el FBS de origen animal. La lámina puede lavarse de nuevo con medio DMEM sin suero para eliminar el FBS completamente. En esta etapa, se elimina el FBS de la lámina, lo que minimiza las posibles reacciones adversas derivadas de los componentes de origen animal cuando se aplica la lámina al cuerpo humano.

La presente invención también proporciona un método de crioconservación de la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo. La lámina puede conservarse a -80 °C en una bolsa criogénica que está rellena con un agente crioconservante que consiste en un 10 % de DMSO y un 5 % de solución de seroalbúmina humana y, a continuación, se sella. Normalmente se sabe que las pieles artificiales (que consisten en células epidérmicas, hipodérmicas, o ambas células) o las células aisladas tratadas con proteasa resultan dañadas al ser crioconservadas a -80 °C, lo que reduce los efectos terapéuticos cuando se aplican a las heridas (*Tissue eng 4 (4): 1403~414, 1988*). De acuerdo con la presente invención, sin embargo, la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas tiene células madre recubiertas de hidrogel, lo que protege las células frente a impactos externos y estrés. En consecuencia, la lámina puede conservarse a -80 °C sin daño celular durante mucho tiempo.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la composición de la presente invención puede tratarse con una cantidad eficaz de al menos un componente que incluya factores de crecimiento, citocinas, hormonas o compuestos o proteínas de la matriz extracelular que son útiles para mejorar la cicatrización de heridas. Algunos ejemplos del componente son GCSF, IL6, IL8, IL10, MCP1, MCP2, factores tisulares, bFGF, KGF, VEGF, PLGF, MMP1, MMP9, TEMP1, TIMP2, TGF-beta1 y HGF, sin limitarse a los mismos.

La presente invención se explica con más detalle por medio de los siguientes Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos pretenden únicamente ilustrar la presente invención.

Ejemplo 1: método de cultivo de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano

El tejido adiposo se obtiene generalmente mediante liposucción, sin estar particularmente limitado a la misma.

Las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo se aislaron a partir de lipoaspirados de acuerdo con los siguientes procedimientos: el tejido adiposo obtenido se lavó tres o cuatro veces utilizando un volumen igual de PBS para eliminar la sangre de los mismos. Al añadir un volumen igual de solución de colagenasa al tejido adiposo, la reacción se llevó a cabo en un baño de agua a 37 °C. El producto de la reacción se colocó en un tubo de centrifuga y se centrifugó a 20 °C y 1500 rpm durante 10 minutos. Después de retirar una capa de grasa como sobrenadante, la solución de colagenasa remanente como capa inferior se separó suavemente sin agitarla. Se añadió un medio estromal a la solución de colagenasa para preparar una suspensión, seguido de una centrifugación a 20 °C y 1200 rpm durante 5 minutos. Aquí, la parte de decantación era una fracción estroma-vascular, mientras que el sobrenadante se desechaba. La fracción estroma-vascular se suspendió en el medio estromal, se inoculó en un recipiente de cultivo y se cultivó durante 24 horas en una estufa de incubación a 37 °C con un 5 % de CO₂. Después de retirar el medio de cultivo y lavar con un tampón de fosfato, la fracción proliferó en un medio estromal, un medio estromal que contiene bFGF a una concentración de 1 ng/ml, o un medio estromal que contiene EGF a una concentración de 5 ng/ml. Cuando las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo crecieron hasta cubrir entre el 80 y el 90 % del recipiente de cultivo, las células se sometieron a un tratamiento con tripsina para aislarlas y obtener células de tipo único.

Ejemplo 2: determinación de la concentración del pegamento de fibrina como hidrogel

Se añadió 1 ml de solución de cloruro cálcico a la trombina liofilizada para obtener una concentración de 400~600 U.I. Como alternativa, la trombina liofilizada se descongeló y se ajustó a la misma concentración. Se preparó una solución madre de fibrinógeno con una concentración de 71,5~126,5 mg/ml añadiendo 1 ml de solución de aprotinina al fibrinógeno liofilizado, o descongelando el fibrinógeno liofilizado. La solución madre se diluyó por etapas en una proporción de 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40. Las células cultivadas durante al menos dos pases en el Ejemplo 1 se recogieron para preparar una suspensión. La trombina se mezcló con la suspensión en una proporción de 40~50:1 (v/v), y la mezcla se mezcló con el fibrinógeno diluido por etapas en una proporción de 1:1 para formar un gel de fibrina. Después de 30 minutos, se añadió al gel completamente congelado un medio de cultivo que contenía un 10 % de FBS y 1 ng/ml de bFGF, y la mezcla se cultivó durante 5 días en una estufa de incubación a 37 °C con un 5 % de CO₂. El segundo día y el quinto día después del cultivo, se recogió y seccionó la mezcla de células y gel de fibrina. Las secciones se tiñeron con 10 µg/ml de naranja de acridina/bromuro de etidio (AO/EtBr), y a continuación se midieron las formas de las células y las tasas de supervivencia con un microscopio de fluorescencia. El quinto día después del cultivo, se añadió WST-1 al cultivo y se determinó el estado de proliferación celular.

La FIG. 1a son fotografías de un microscopio de fluorescencia que muestran las formas y el número de células madre en el gel de fibrina preparado a partir de una solución diluida de fibrinógeno. En el gel de fibrina hecho con la solución madre de fibrinógeno, la mayoría de las células mantenían intacta su forma esférica y rara vez proliferaban. Por otro lado, a medida que aumenta la tasa de dilución, las células formaron rápidamente la forma de fibroblastos y proliferaron más considerablemente. En el gel de fibrina (36-64 mg) de solución madre de fibrinógeno, se observaron algunas células muertas. En el gel de fibrina hecho con la solución diluida de fibrinógeno, sin embargo, no se encontró ninguna célula muerta. Los resultados muestran que el gel de fibrina de alta concentración de 36-64 mg tiene una ligera citotoxicidad para las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo, mientras que el gel de fibrina a la concentración de 18-32 mg o inferior no tiene citotoxicidad.

La FIG. 1b es un gráfico que muestra la capacidad de proliferación de las células madre en función del gel de fibrinógeno, lo que se determina cuantitativamente utilizando WST-1. Como se muestra en la FIG. 1b, la absorbancia aumenta a medida que aumenta la tasa de dilución. Es decir, las células madre proliferan mejor en el gel de fibrina hecho con fibrinógeno diluido 20 veces (3,6~6,3 mg/ml) o 40 veces (1,8~3,2 mg/ml).

Ejemplo 3: preparación de una lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano

Las células madre mesenquimatosas cultivadas durante al menos dos pases del Ejemplo 1 se recogieron y se añadieron a un medio de expansión para preparar una suspensión. Tomando como base los resultados del Ejemplo 2, se añadió trombina a la suspensión celular hasta una concentración final de 8~15 U.I. El soporte biodegradable se recubrió uniformemente con aproximadamente 3~6,5 mg/ml de fibrinógeno, malla de Vicryl o membrana amniótica bovina, o soporte no degradable, un cuadrado de gasa o película de PET de 10 × 10 cm² de tamaño. Posteriormente, el soporte se recubrió con la suspensión celular que contenía trombina en una cantidad de aproximadamente 5000 células/cm², y el resultante se agitó suavemente arriba y abajo para que se formara el gel celular de fibrina uniformemente y se adhiriera al soporte. Después de 30 minutos, se añadió un medio de expansión al gel completamente congelado, y la mezcla se cultivó durante 3-5 días en una estufa de incubación a 37 °C con un 5 % de CO₂.

La FIG. 2a son fotografías que muestran la lámina preparada mezclando células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano con hidrogel de fibrina, fijando la mezcla a un soporte biodegradable, malla de Vicryl o membrana amniótica bovina, o soporte no degradable, gasa o lámina de PET, y a continuación, cultivando el resultante. De acuerdo con la presente invención, la resistencia de la lámina se mejora fijando el hidrogel celular a un soporte biodegradable o no degradable para formar una lámina, y la lámina reforzada puede usarse más cómodamente. La lámina de hidrogel celular biodegradable o no degradable tiene un espesor de 0,1~2 mm, lo que impide que la lámina se desgarre cuando se aplica clínicamente a las heridas, y permite que se incluyan en la misma suficientes células para potenciar los efectos curativos.

La FIG. 2b son fotografías de un microscopio óptico o un microscopio de fluorescencia que muestran la lámina después de ser teñida con AO/EtBr. Como se muestra en la FIG. 2b, se distribuyeron células madre mesenquimatosas esféricas derivadas de tejido adiposo a baja concentración en el soporte el día 0. Por otro lado, después de un cultivo durante 5 días, se observó que las células de tipo fibroblasto se adherían al soporte y proliferaban. Se distribuyeron uniformemente aproximadamente 20 000~60 000 células por cm² de lámina, y el 100 % de las células sobrevivieron.

De acuerdo con otra realización, la lámina cultivada durante 5 días se lavó con solución salina para eliminar el FBS, y se añadió a la misma DMEM sin suero, y a continuación se dejó la mezcla a 37 °C durante 10 días. El tercer día, el quinto día, el séptimo día y el décimo día, se determinaron las tasas de supervivencia de las células tras la tinción con EtBr/AO. Como resultado, las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo de la lámina preparada de acuerdo con la presente invención mantuvieron la forma de tipo fibroblasto incluso en un medio sin suero, y al menos el 98 % sobrevivió el tercer día, al menos el 90 % sobrevivió el séptimo día, y al menos el 80 % sobrevivió el décimo día, como se muestra en la FIG. 2c.

Ejemplo 4: crioconservación de la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano

La lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable preparada en el Ejemplo 3 se lavó para eliminar el medio de cultivo celular, y a continuación se crioconservó a -80 °C en una bolsa criogénica que está rellena con un agente crioconservante (DMSO al 10 % y solución de seroalbúmina humana). Después de aproximadamente 1 mes, la bolsa criogénica se sumergió en un baño de agua a una temperatura constante de 37 °C y, a continuación, se drenó el agente crioconservante fundido. Se añadió a la misma solución salina, se agitó de arriba abajo, y a continuación se drenó. Después de eliminar completamente el agente crioconservante remanente mediante 1~3 lavados adicionales, la lámina se tiñó con AO/EtBr y a continuación se determinó la tasa de supervivencia.

Como se muestra en la FIG. 3, la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable que se descongela tras haber sido crioconservada a -80 °C mantenía la forma y la resistencia iniciales de la lámina.

Además, al menos el 95 % de las células de la lámina sobrevivieron. Los resultados muestran que la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable preparada de acuerdo con la presente invención puede crioconservarse a -80 °C sin daño celular durante mucho tiempo.

Ejemplo experimental 1: características biológicas del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano

Las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo aisladas y cultivadas en el ejemplo 1 de acuerdo con la técnica anterior (patente coreana n.º 1.328.604) son positivas para CD10, C13, CD29, CD44, CD59, CD71, CD90, CD105 y Oct 4, y negativas para CD34, CD45, CD104, CD106 y Stro-1. La lámina preparada en el Ejemplo 3 utilizando las células obtenidas en el Ejemplo 1 se trató con enzimas para disolver el pegamento de fibrina y aislar las células de tipo único. Las células recogidas se colocaron en un tubo de centrífuga de 1,5 ml. Tras añadir 1 ml de una solución de tinción para FACS (solución tampón de fosfato que contiene un 1 % de suero bovino fetal) y mezclar de forma homogénea, se centrifugaron a 10 000 rpm durante 5 segundos. Después de retirar el sobrenadante, el producto remanente se suspendió en 1 ml de solución de tinción para FACS y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 segundos. Después de retirar el sobrenadante, el producto remanente se resuspendió en 300 µl de la solución de tinción para FACS. La muestra resultante se distribuyó en nuevos tubos de centrífuga, de tal manera que se colocaron aproximadamente de 0,5 a 1,1 × 10⁶ células en cada uno de los tubos de centrífuga, dependiendo del número de muestras. Después de añadir un anticuerpo a los mismos, el contenido del tubo se sometió a reacción en un baño de hielo durante 30 minutos. A continuación, el producto de la reacción se resuspendió en 1 ml de la solución de tinción para FACS y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 segundos, seguido de la eliminación del sobrenadante. El producto remanente se resuspendió añadiendo al mismo de 400 a 500 µl de una solución de fijación para FACS. La suspensión obtenida se sometió a un análisis con un citómetro de flujo.

Como resultado, las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo cultivadas en hidrogel de acuerdo con la presente invención siguen manteniendo las características inmunológicas que muestran una respuesta positiva a CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, y una respuesta negativa a CD34 y CD45, como se muestra en la FIG. 4. La expresión de CD105 disminuye al 70 % o menos, lo que es una reducción del 20 % o más en comparación con el resultado obtenido con las células madre cultivadas mediante el método descrito en la técnica anterior.

Ejemplo experimental 2: secreción de factores de crecimiento por parte del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano

El soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable preparado en el Ejemplo 3 o la lámina crioconservada del Ejemplo 4 se lavó después de la descongelación con PBS y se cortó a un tamaño de 0,8 × 0,8 cm³. Se colocaron dos láminas en una placa de 24 pocillos y se añadió 1 ml de DMEM a la misma. Tras 72 horas de cultivo en una estufa de incubación a 37 °C con un 5 % de CO₂, se recogió el sobrenadante y a continuación se determinaron las cantidades de VEGF y HGF, que son factores de crecimiento representativos secretados por las células madre mesenquimatosas, mediante el método ELISA. Como resultado, se confirma que las láminas secretan HGF y VEGF, como se muestra en la FIG. 5 a.

De acuerdo con otra realización, el sobrenadante recogido se analizó con el kit de matriz de citocinas relacionadas con la angiogénesis. Como resultado, se confirma que las láminas secretan factores de crecimiento, que incluyen HGF y VEGF, y diferentes citocinas tales como Serpina E1 (PAI-1) y F1 (PDEF), TIMP-1, CXCL8 (IL-8), FGF-2 y DPPIV (CD26), que fomentan la angiogénesis, como se muestra en la FIG. 5b. Los resultados muestran que las células madre mesenquimatosas cultivadas mediante el uso de hidrogel y del soporte biodegradable y/o no degradable de acuerdo con la presente invención facilitan la cicatrización de las heridas mediante la secreción continua de diferentes factores de crecimiento y citocinas que fomentan la proliferación celular y la angiogénesis.

Ejemplo experimental 3: actividad secretora de ECM del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano

El soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable preparado en el Ejemplo 3 se cortó en secciones congeladas y a continuación se fijó utilizando PBS que contenía un 3,7 % de formaldehído durante 30 minutos. Después de lavar las secciones fijadas tres veces con PBS, el producto lavado se sometió a permeabilización y bloqueo utilizando PBS que contenía un 5 % de suero normal de cabra y un 0,1 % de Triton X-100 durante 30 minutos. Tras añadir PBS que contenía un anticuerpo primario al mismo y dejar reaccionar a 37 °C durante 1 hora, el producto de la reacción se lavó tres veces con PBS y se hizo reaccionar con un anticuerpo secundario a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Después, el producto se lavó de nuevo tres veces con PBS, el producto lavado se montó y se observó con un microscopio de fluorescencia.

La FIG. 6 son fotografías (x400) que muestran la actividad de secreción de proteínas de la matriz extracelular (ECM) de las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en la lámina. Como se muestra en las fotografías, el soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo biodegradable o no degradable de acuerdo con la presente invención generalmente presenta una respuesta positiva al colágeno de tipo I, fibronectina y laminina. Es decir, las células que componen el soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo biodegradable o no degradable preparado de acuerdo con la presente invención pueden secretar lotes de diferentes tipos de matrices extracelulares, que permanecen en hidrogel y facilitan la cicatrización de las heridas cuando se trasplantan a un cuerpo.

Ejemplo experimental 4: actividad inmunomoduladora del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas alogénicas derivadas de tejido adiposo humano

El soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable preparado en el Ejemplo 3 o la lámina crioconservada del Ejemplo 4 se lavó después de la descongelación con PBS y se cortó a un tamaño de 0,8 × 0,8 cm³. Cada lámina se colocó en una placa de 24 pocillos. Los monomorfonucleares periféricos (PBMC) obtenidos a partir de un donante de diferente antígeno leucocitario humano (HLA) se añadieron a la placa de 24 pocillos a razón de 5 × 10⁵ células/pocillo. Como control positivo, los monomorfonucleares periféricos se trataron con el mitógeno fitohemaglutinina (PHA) para inducir la respuesta inmunitaria de los monomorfonucleares periféricos. El tercer día después de la reacción, se recogió un sobrenadante y se sometió a la medición de la cantidad de TNF-α secretado mediante el método ELISA.

La FIG. 7a es un gráfico que muestra la inmunogenicidad del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas alogénicas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable. Como se muestra en el gráfico, el control positivo, los monomorfonucleares periféricos activadas por la PHA, mientras que en la reacción con el soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas alogénicas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable, el TNF-α rara vez era secretado. Es decir, puede observarse que el soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas alogénicas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable no induce respuesta inmunitaria.

De acuerdo con otra realización, se añadieron 5 × 10⁵ monomorfonucleares periféricos a una placa de 24 pocillos y se activaron con PHA para inducir una respuesta inmunitaria. La lámina del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable preparada en el Ejemplo 3 o 4 se cortó a un tamaño de 0,8 × 0,8 cm³ y cada lámina se colocó en la placa. El tercer día después de la reacción, se recogió un sobrenadante y se sometió a la medición de la cantidad de TNF-α secretado.

Como resultado, la lámina del soporte con células madre mesenquimatosas alogénicas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable en monomorfonucleares periféricos activados por PHA redujo la cantidad de TNF-α secretado en al menos un 60 %, como se muestra en la FIG. 7b. Es decir, se puede observar que la lámina del soporte con células madre mesenquimatosas alogénicas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable no induce una respuesta inmunitaria, y disminuye considerablemente la secreción de TNF-α, que es secretado en grandes cantidades por las células inmunitarias cuando se produce una respuesta inmunitaria para aumentar así la actividad inmunitaria. En consecuencia, cuando se aplica a heridas diabéticas, la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo biodegradable o no degradable puede aliviar la inflamación crónica de la herida y fomentar su cicatrización.

Ejemplo experimental 5: efecto cicatrizante de la lámina de soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo

Los ratones diabéticos db/db machos obtenidos de SLC (Japón) se aclimataron hasta que la glucosa en sangre fue de 250 mg/dl o superior. Para la cirugía, se administró por vía intraperitoneal a los ratones una mezcla 1:1 de Rompun y Zoletil 50. Tras eliminar el pelo de la zona dorsal de los ratones anestesiados con una depiladora, la zona se desinfectó con isopropanol. Se realizó una herida de biopsia circular de 8 mm de diámetro en ambos lados de la zona dorsal de cada ratón y se fijó a la misma una férula de silicona para mantener la herida e impedir su contracción. La herida se fotografió con una cámara digital. La lámina del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas

derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable preparada en el Ejemplo 3 se cortó del mismo tamaño que la herida y se colocó cubriendo la herida. La herida se vendó con Tegaderm hasta cubrirla totalmente, y a continuación se vendó con una venda elástica de sujeción sobre la misma. El quinto día, después de retirar cuidadosamente el Tegaderm, se tomó una fotografía de la herida y a continuación se volvió a cubrir con Tegaderm. Posteriormente, se tomaron fotografías secuenciales de la herida cada tres días durante aproximadamente dos semanas. La superficie de la herida se calculó utilizando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ de los NIH, y a continuación se convirtió en un porcentaje (%) basado en la superficie inicial de la herida.

El resultado mostró una tendencia a la reducción del tamaño de la herida en el grupo tratado con la lámina del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable en comparación con el del grupo de control con vehículo o el grupo de control con hidrogel el octavo día tras la formación de la herida, pero sin mostrar diferencias significativas, como se muestra en la FIG. 8a. A partir del undécimo día, sin embargo, el tamaño de la herida del grupo tratado con la lámina del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable se redujo significativamente en comparación con el del grupo de control con vehículo o el grupo de control con hidrogel. El decimocuarto día, las heridas de la mayoría de los grupos tratados con la lámina del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable estaban cerradas por completo, mientras que las del grupo de control con vehículo, el grupo de control con hidrogel y el grupo tratado con una única célula se mantuvo en la mayoría de los casos, excepto en algunos casos. El tamaño de la herida del grupo tratado con un único tipo de célula cultivada mediante el método de la técnica anterior se redujo en comparación con el del grupo de control, pero sin mostrar diferencias significativas. Es decir, puede observarse que las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano de un único tipo cultivadas mediante el método de la técnica anterior tienen un efecto curativo incompleto en la herida diabética, mientras que la lámina del soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo humano biodegradable o no degradable tiene un efecto curativo superior en la herida diabética.

[Aplicabilidad industrial]

La composición o la lámina que comprende células madre mesenquimatosas muy activas de acuerdo con la presente invención tiene unos efectos superiores de regeneración de la piel y cicatrización de heridas y acorta el periodo terapéutico en comparación con los preparados farmacéuticos convencionales, ya que las células madre de alta actividad pueden aplicarse directamente en la herida sin un proceso de aislamiento (selección) con proteasa, y las matrices extracelulares tales como colágeno, laminina, fibronectina y elastina secretadas por las células madre en la fase de cultivo están incluidas por completo en el hidrogel, por lo que puede usarse eficazmente como composición o lámina para la regeneración de la piel y la cicatrización de heridas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de preparación de una lámina para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, que comprende las siguientes etapas:
- (a) aislar células madre mesenquimatosas a partir de tejido adiposo y cultivar las células madre en un medio de expansión durante al menos dos pases;
- 10 (b) combinar las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo cultivadas con un soporte no degradable mediante un hidrogel para obtener un soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en hidrogel; y
- 15 (c) cultivar el soporte de células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo en hidrogel obtenido en la etapa (b) en un medio de expansión,
- en donde el medio de expansión de la etapa (a) o (c) comprende al menos un factor seleccionado del grupo que consiste en FBS (suero bovino fetal), bFGF (factor básico de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β -1), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) e IGF-1 (factor de crecimiento insulinoide);
- 20 en donde el hidrogel es un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en pegamento de fibrina, ácido hialurónico, gelatina, ácido algínico, celulosa y pectina; y
- 25 en donde el soporte no degradable se selecciona entre una fibra de tejido no tejido esterilizada, película de PET (tereftalato de polietileno), película de PE (polietileno), película de PP (polipropileno) o combinaciones de las mismas.
- 30 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el pegamento de fibrina comprende fibrinógeno a una concentración de 0,5 a 30 mg/ml.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el pegamento de fibrina comprende fibrinógeno a una concentración de 0,5 a 10 mg/ml.
- 35 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el pegamento de fibrina comprende trombina a una concentración de 1 a 50 U.I./ml.
- 40 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa (d) activar las células de la etapa (c) proporcionando al menos un estímulo seleccionado del grupo que consiste en un estímulo físico, un estímulo hipóxico, un estímulo mitógeno y un estímulo de factor inflamatorio.
- 45 6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, la herida es una herida diabética.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además la etapa (e) crioconservar el soporte de hidrogel con células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo de la etapa (c) en un agente crioconservante que comprende del 1 al 20 % p/v de DMSO (dimetilsulfóxido) y del 1 al 50 % p/v de seroalbúmina humana, en donde la tasa de supervivencia de las células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo es del 90 % o superior tras su descongelación.
- 50 8. Una composición para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, que comprende células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo, un hidrogel y un soporte no degradable, en donde el hidrogel incluye factores de crecimiento que fomentan el crecimiento celular y la angiogénesis, y una matriz extracelular secretada por las células madre mesenquimatosas cuando las células madre mesenquimatosas, el hidrogel y el soporte se cultivan en un medio de expansión;
- 55 en donde el hidrogel es un hidrogel seleccionado del grupo que consiste en pegamento de fibrina, ácido hialurónico, gelatina, ácido algínico, celulosa y pectina; y en donde el soporte no degradable se selecciona entre una fibra de tejido no tejido esterilizada, película de PET (tereftalato de polietileno), película de PE (polietileno), película de PP (polipropileno) o combinaciones de las mismas.
- 60 9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el pegamento de fibrina comprende fibrinógeno a una concentración de 0,5 a 30 mg/ml.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el pegamento de fibrina comprende fibrinógeno a una concentración de 0,5 a 10 mg/ml.
- 65 11. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el pegamento de fibrina comprende trombina a una concentración de 1 a 50 U.I./ml.

12. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, la herida es una herida diabética.

5 13. Una lámina para la regeneración de la piel o la cicatrización de heridas, que comprende una de las composiciones de las reivindicaciones 8 a 12 como componente activo.

FIGURA 1a

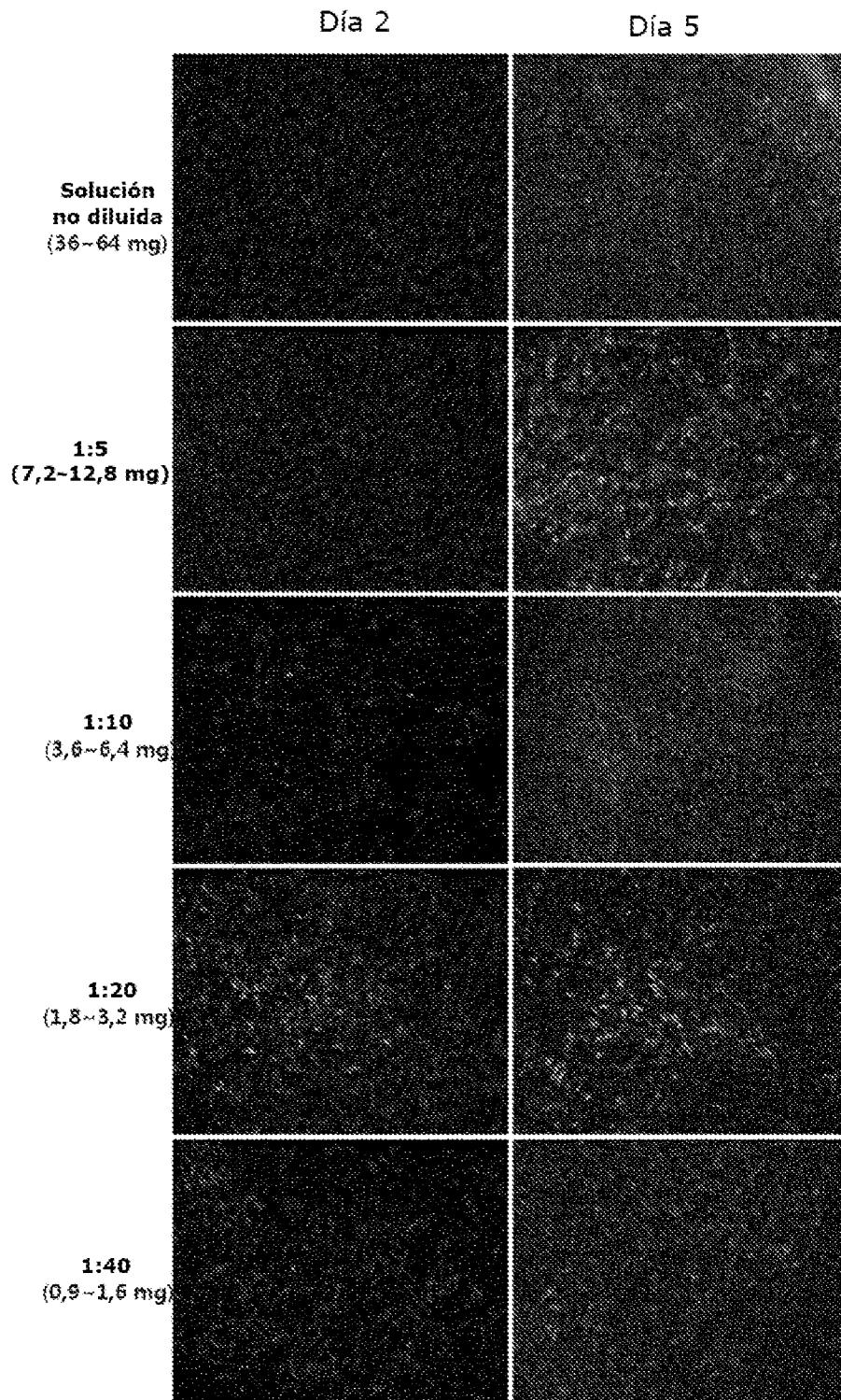


FIGURA 1b

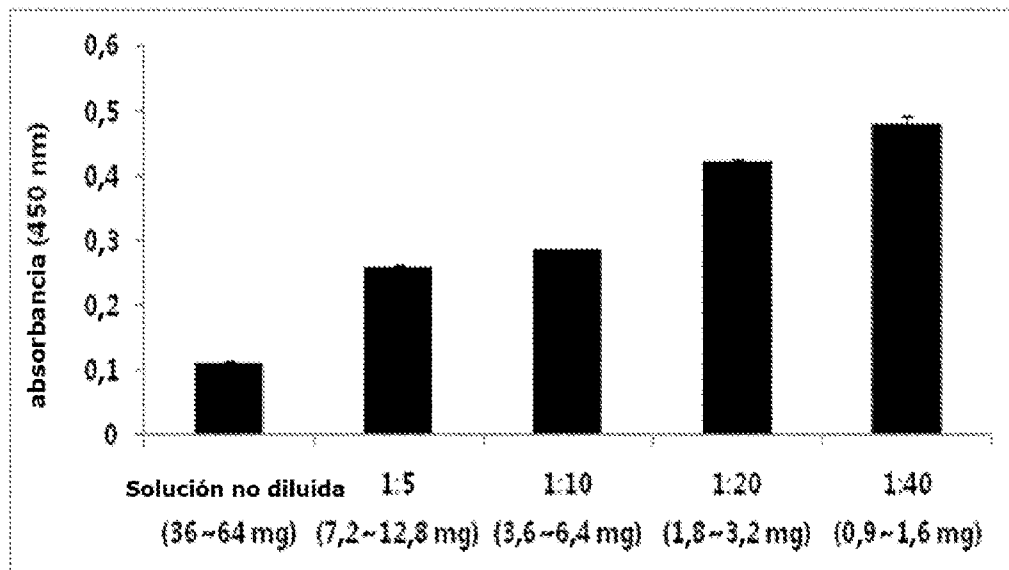


FIGURA 2a

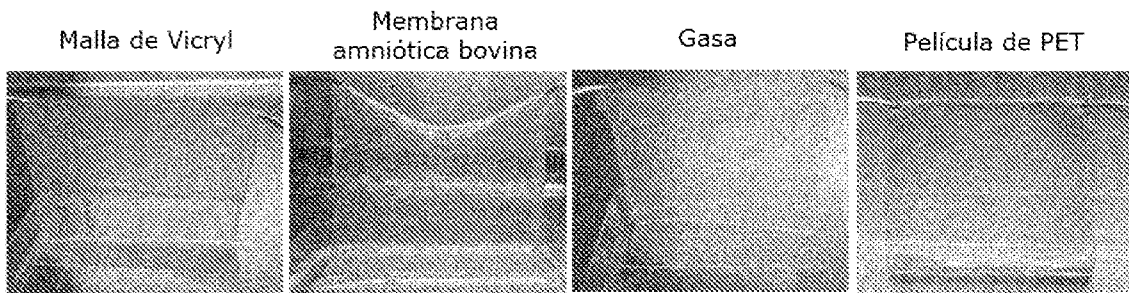


FIGURA 2b

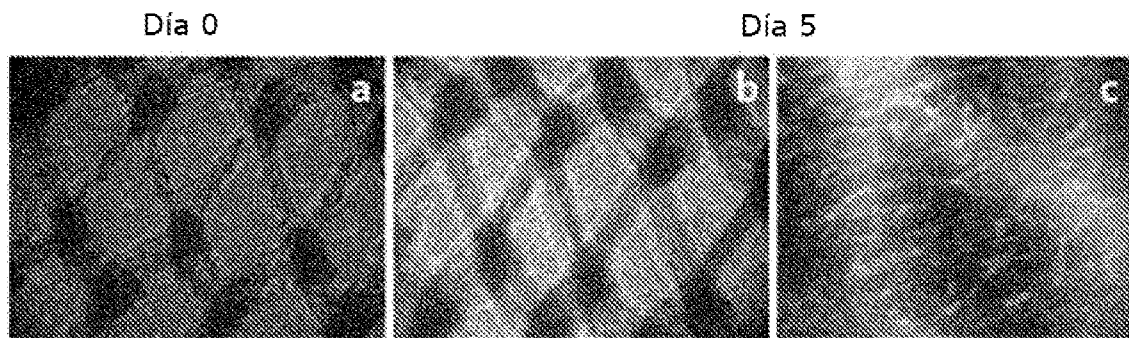


FIGURA 2c

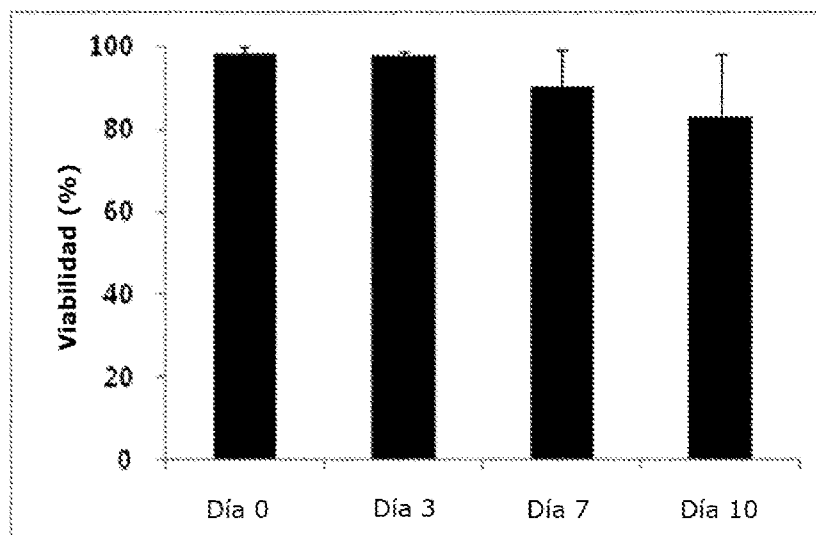


FIGURA 3a

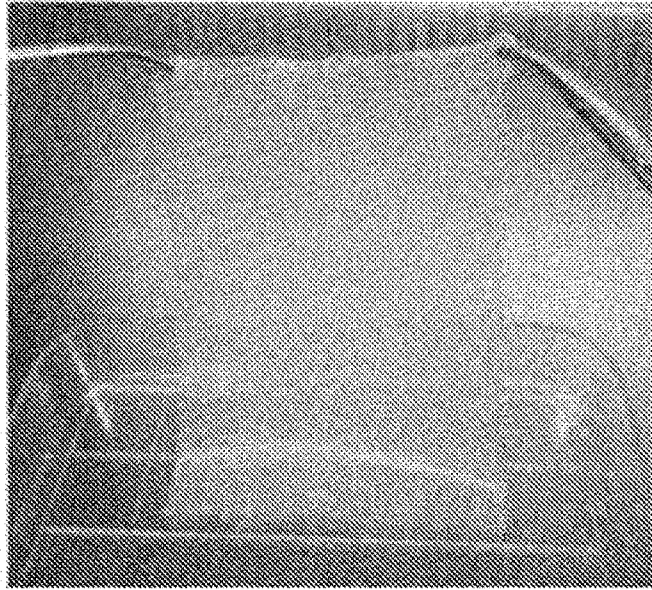


FIGURA 3b

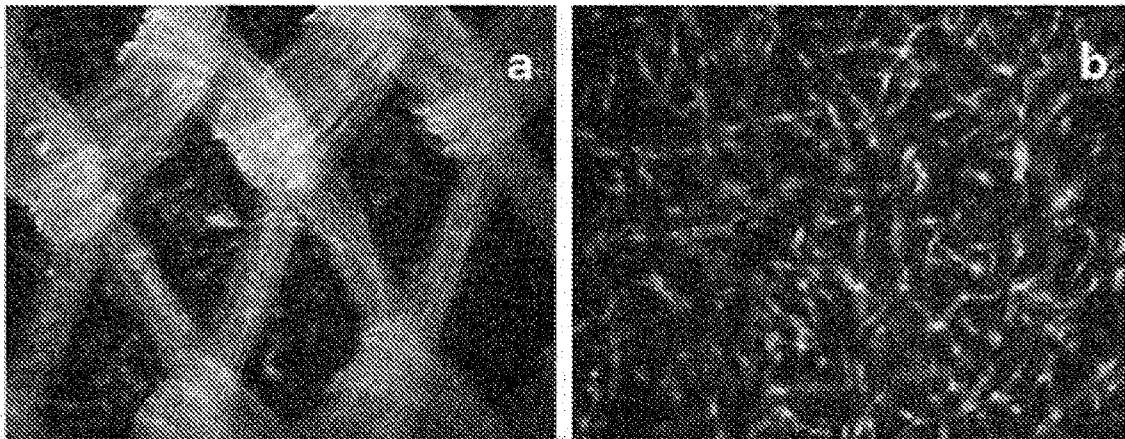


FIGURA 4

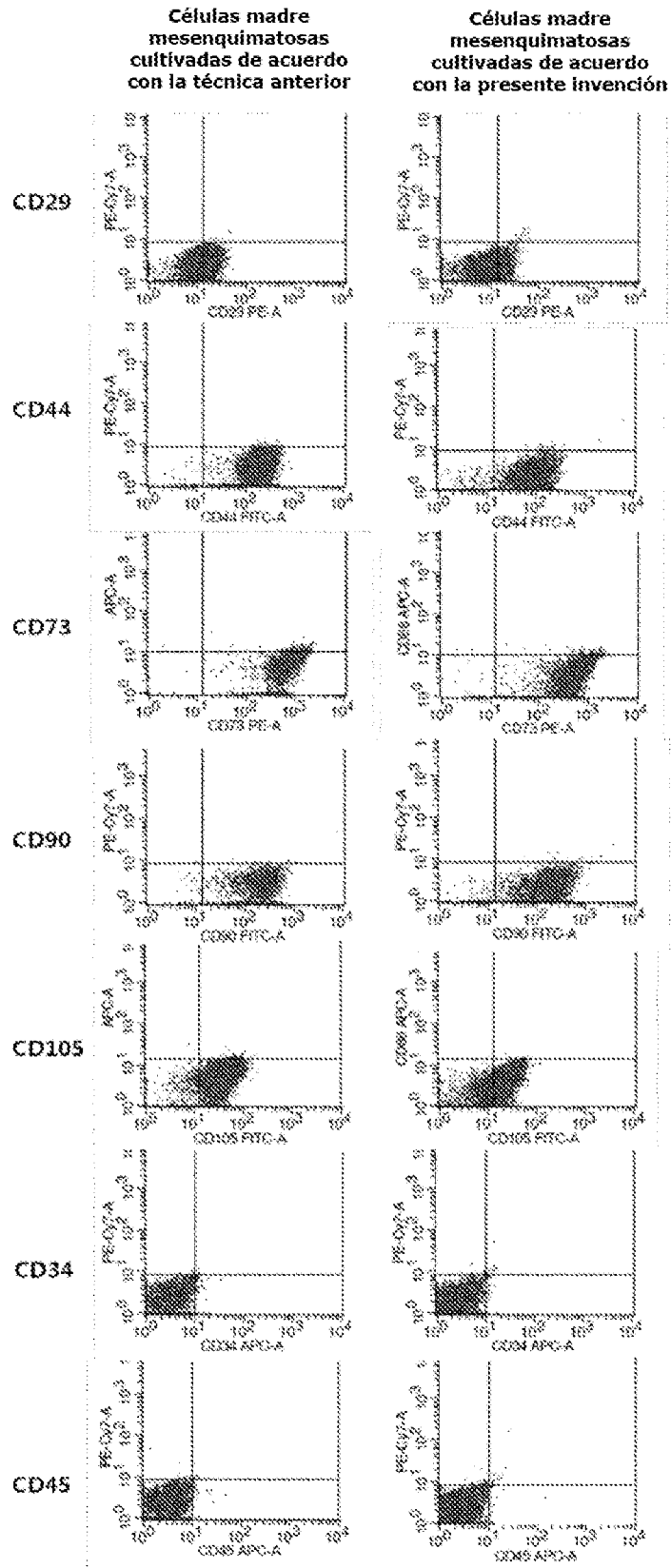


FIGURA 5a

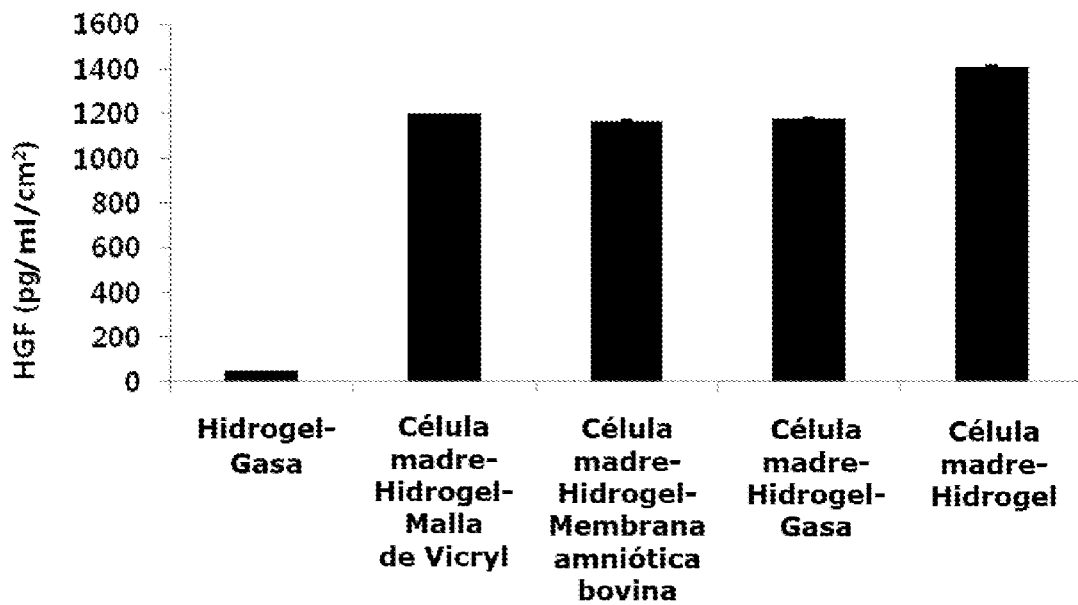
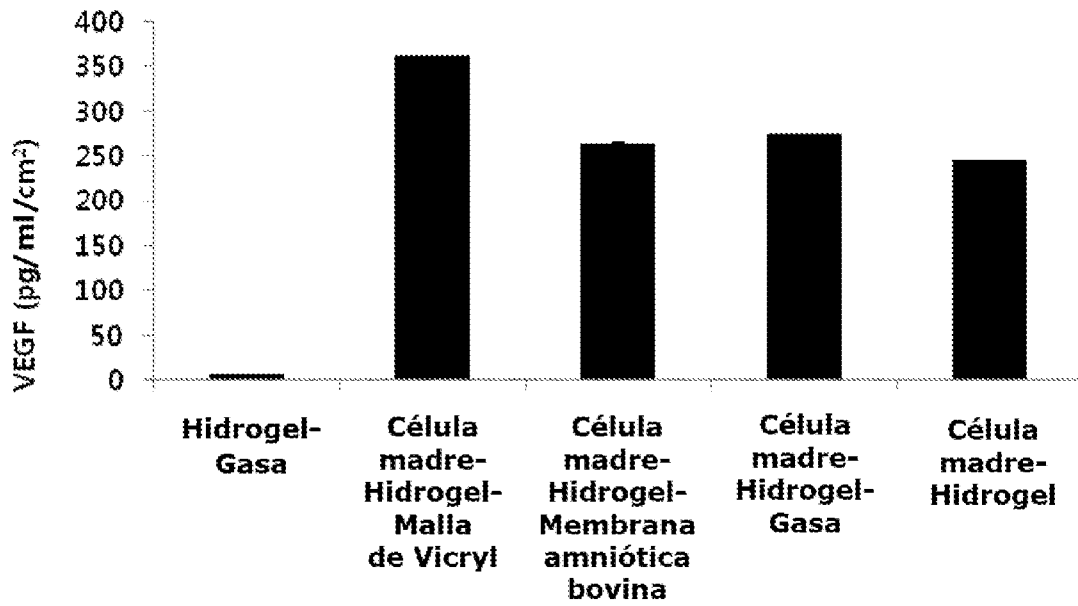
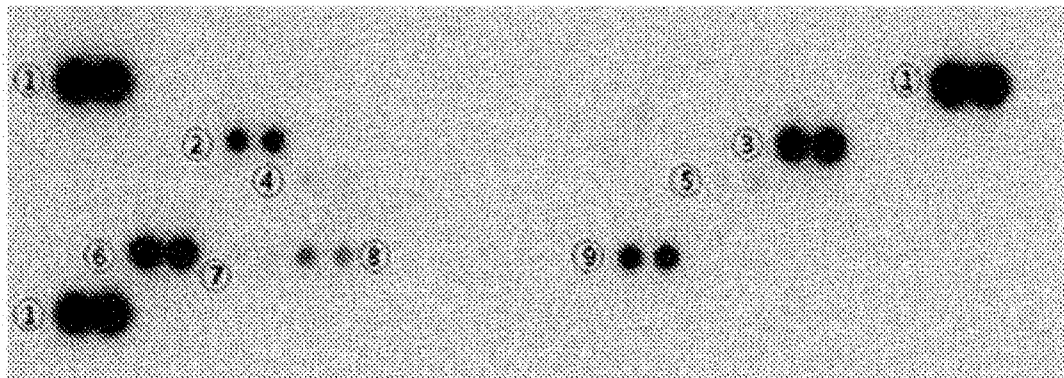


FIGURA 5b



- | | |
|-----------------------|----------------------|
| ① Punto de referencia | ⑥ Serpina E1 / PAI-1 |
| ② DPPIV / CD26 | ⑦ Serpina F1 / PDEF |
| ③ FGF-2 | ⑧ TIMP-1 |
| ④ HGF | ⑨ uPA |
| ⑤ CXCL8 / IL-8 | |

FIGURA 6

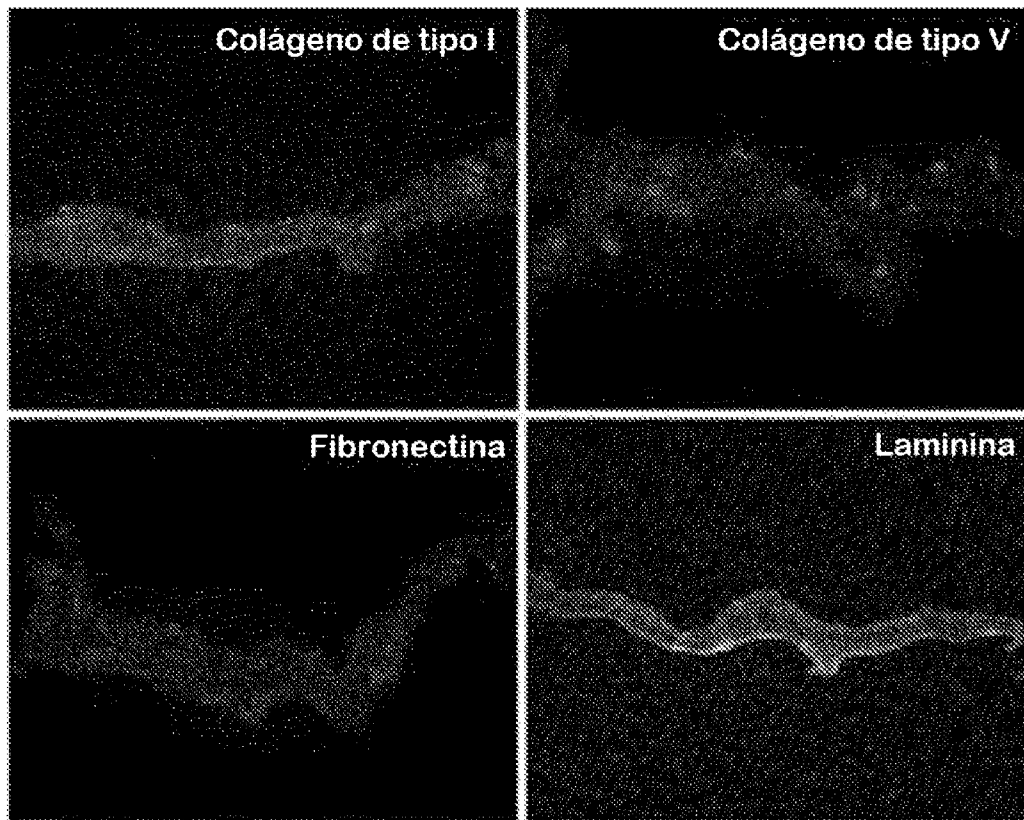


FIGURA 7a

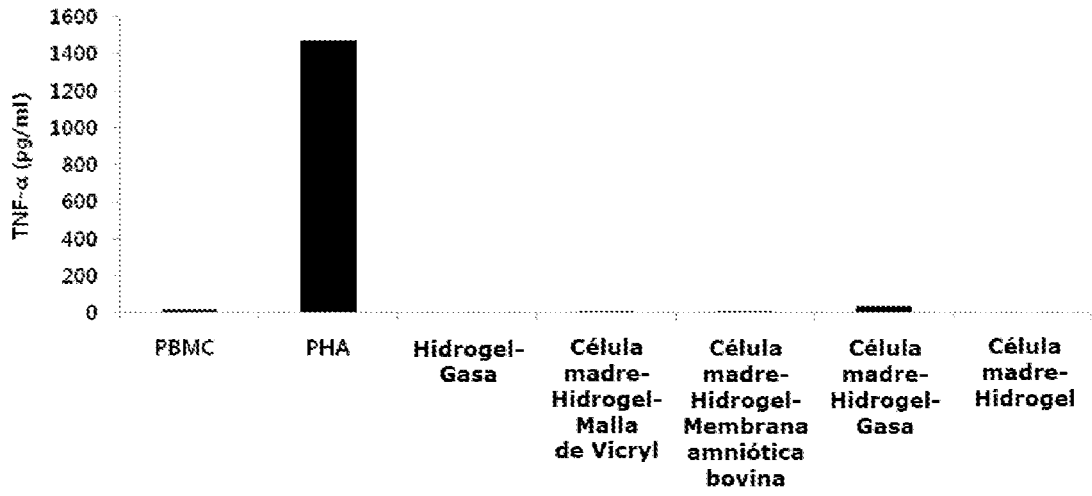


FIGURA 7b

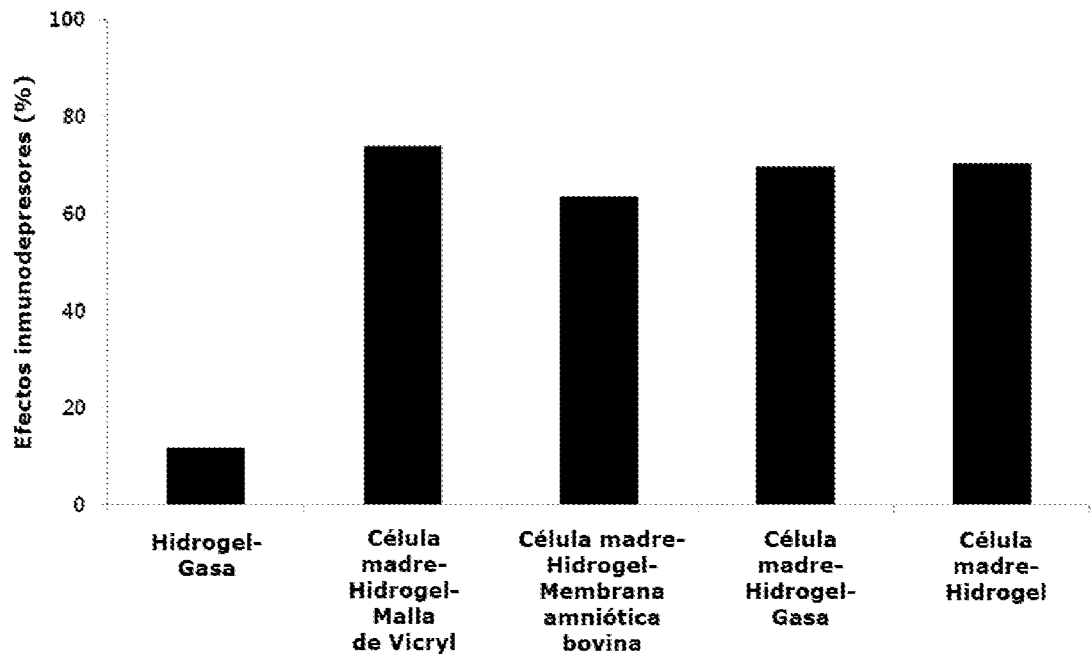


FIGURA 8a

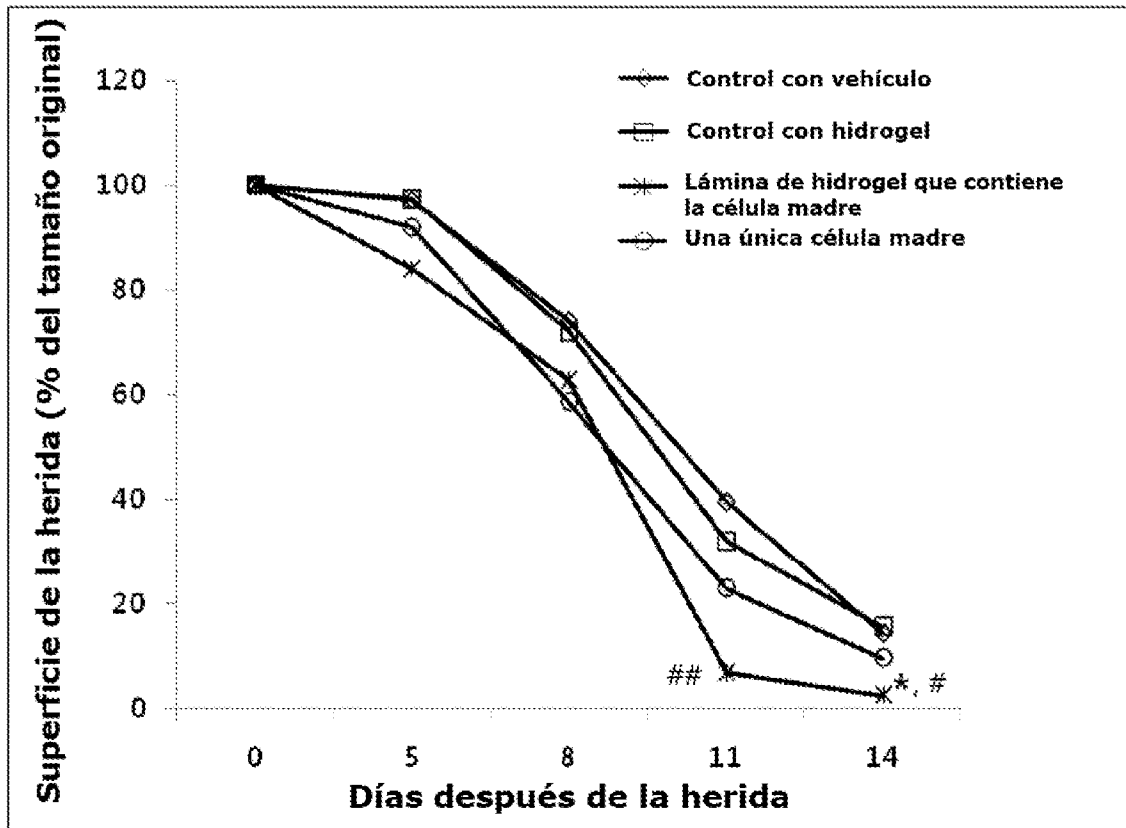


FIGURA 8b

