



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 276**

51 Int. Cl.:
A61K 35/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02709917 .5**

96 Fecha de presentación : **07.02.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1357922**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.11.2003**

54 Título: **Técnica de preparación de suspensión celular y uso de la misma.**

30 Prioridad: **07.02.2001 AU PR2989**
04.04.2001 US 281527 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.11.2011

73 Titular/es: **McComb Foundation Inc.**
Unit 5, 6 Brodie-Hall Drive
Bentley, Western Australia 6102, AU

72 Inventor/es: **Stoner, Marie y**
Wood, Fiona

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 276 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

Técnica de preparación de suspensión celular y uso de la misma

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una sencilla, rápida y rentable técnica para injertar células y, en concreto, a un procedimiento para preparar una suspensión de células de una muestra de tejido obtenida de un sitio del donante y para aplicar dicha suspensión de células a un sitio del receptor.

Técnica anterior

10 Los expertos en la técnica conocen muchos procedimientos de tratar heridas. Por ejemplo, existen técnicas de injerto de piel cuyo objetivo es reconstruir la piel que cubre áreas del cuerpo en el que se han producido daños o defectos en la piel. En general, estos tipos de injertos se clasifican de acuerdo con su relación huésped-donante y por su espesor. El injerto más aplicado en la clínica es el injerto autólogo, en el que se extrae tejido de un área del cuerpo y se aplica en otra área. A continuación, el tejido injertado desarrolla un nuevo suministro de sangre y se une a los tejidos subyacentes.

15 Hay varios tipos de injertos de piel que se usan actualmente, incluidos injertos espesor parcial y de espesor total y microinjerto. Cada uno de estos tipos de injerto debe prepararse usando ciertas técnicas, cada una de las cuales tiene sus ventajas y desventajas hereditarias. Los injertos de espesor dividido a menudo requieren una experiencia y tiempo considerables, además de un caro equipo. Además, los sitios para la donación son dolorosos, tienen como resultado la cicatrización y limitan el área que se va a cubrir. Aunque puede haber más éxitos que injertos de espesor total, normalmente son menos atractivos estéticamente. Los injertos de espesor total requieren menos experiencia y equipos menos caros y si aspecto estético es mejor que el de los injertos de espesor parcial. No obstante, los injertos de espesor total no "cogen" tan bien como los injertos de espesor parcial. Los microinjertos se consiguen con mayor facilidad y no requiere instrumentos especiales. No obstante, su aspecto estético no es tan bueno como el de otras técnicas, ya que la cicatriz resulta inaceptable.

25 Una variación de las técnicas de injerto anteriores es el injerto de malla, que es un tipo de injerto de piel de espesor parcial o de espesor total en el que se hacen hileras paralelas de hendiduras en el tejido que se está tratando. Algunas de las ventajas de los injertos de malla incluyen: Una mayor cobertura del área afectada, drenaje de sangre o de suero desde debajo del injerto y mayor conformidad del injerto con las áreas no uniformes del receptor. Esta técnica ha tenido mucho éxito, con un 90 a 100 por ciento de "enganche" cuando los injertos se han aplicado sobre lechos de granulación sanos.

30 Una alternativa al injerto de piel parcial es formar una ampolla bajo succión en un sitio del donante y transplantarlo al sitio del receptor. La producción de ampollas para tratar heridas se lleva usando desde la década de 1960. Las ampollas se producen con un dispositivo de succión, como Dermavac™, a una presión de succión de aproximadamente 0,03-0,04 MPa durante 1-2 horas. A continuación se cortan las ampollas y se colocan sobre la herida. El tiempo de cicatrización es de aproximadamente 10-14 días. Este procedimiento tiene varias desventajas, tales como la cantidad de tiempo requerido para preparar el injerto es demasiado largo y el injerto puede no tener como resultado la repigmentación del área; o una pigmentación desigual es frecuente alrededor de los bordes del área de tratamiento.

40 El microinjerto se ha convertido en el abordaje más habitual para cubrir un área grande e implica el "recorte" de una serie de secciones muy pequeñas de tejido de un lugar del donante y su aplicación a un vendaje, que, a su vez, se aplica en el área herida.

45 La tecnología más avanzada para la generación de un tejido *in vitro* es cultivar epidermis. Los autoinjertos epiteliales cultivados (AEC) son un auxiliar importante en la cobertura de quemaduras y otras situaciones en las que áreas grandes de la superficie corporal experimentan pérdida de piel. Hay muchos centros de todo el mundo con instalaciones para cultivo tisular cuyo objetivo es producir injertos epiteliales autólogos para usar en una amplia variedad de aplicaciones. La utilidad y la aplicación de los AEC están relacionadas con su capacidad para conseguir láminas de células confluentes adecuadas para injertos. Esta técnica supera muchas de las desventajas de los tratamientos previos descritos con anterioridad. Por ejemplo, los autoinjertos epiteliales cultivados reducen la demanda de puntos del donante. No obstante, estos autoinjertos son de crecimiento lento y requieren tiempo para cultivar los injertos, lo que a menudo supera el tiempo de preparación de los puntos del receptor.

50 La presente invención proporciona una suspensión celular junto con un procedimiento para preparar la suspensión y un dispositivo para su preparación, cada uno de los cuales busca mejorar una o más de las desventajas asociadas con la tecnología de injertos de la técnica anterior.

Resumen de la invención

La invención objeto se refiere a un procedimiento para la preparación de una suspensión celular única, en el que el procedimiento rápido, eficiente y simple de preparar y aplicar. También se refiere a la suspensión celular única para usar en el tratamiento de pacientes que necesiten cirugía de injerto cutáneo.

5 De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para preparar una suspensión celular adecuada para aplicar a un paciente, en el que el procedimiento es como se ha definido en la reivindicación 1 adjunta.

10 En una forma preferida de la invención, el medio de disociación es de naturaleza química, tal como una enzima que es capaz de romper las uniones celulares, como, por ejemplo, tripsina. Además, preferentemente, la suspensión celular filtrada se diluye hasta una densidad celular adecuada usando una solución de nutrientes que puede ser cualquiera desde una solución de sales básicas hasta una solución de nutrientes más compleja.

15 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona una suspensión celular producida de acuerdo con el procedimiento anterior para usar en el tratamiento de pacientes como se especifica adicionalmente en la reivindicación 7 adjunta. Preferentemente, las células en la suspensión son células autólogas (es decir, se aíslan del paciente que requiere un autoinjerto). Los inventores han observado que retirando suero xenogénico de la suspensión celular, existe menos probabilidad de transmisión de infección y se eliminan las reacciones xenogénicas entre un paciente y el suero. Otra característica de la suspensión celular producida de acuerdo con el procedimiento anterior es que la muestra de tejido usada para aislar las células en la suspensión se retira de la solución enzimática antes de recolectar las células. Cuando las células se exponen a las enzimas capaces de romper la adhesión intercelular, la viabilidad de la suspensión celular disminuye con el tiempo, de modo que se reduce la eficiencia del injerto cuando se aplica a un paciente. Se ha observado que la suspensión celular producida de acuerdo con el procedimiento anterior posee mayor viabilidad celular en comparación con los procedimientos comparativos que cosechan las células a intervalos regulares mientras el tejido está sumergido en presencia de enzimas como la tripsina.

25 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención se proporciona una suspensión celular para usar en el tratamiento de pacientes como se especifica adicionalmente en la reivindicación 9 adjunta.

Descripción de las figuras

La **Figura 1** ilustra una vista en perspectiva del aparato usado para preparar la suspensión celular de acuerdo con la presente invención, con la tapa abierta y el segundo miembro en su sitio.

30 La **Figura 2** ilustra una vista en perspectiva del aparato usado para preparar la suspensión celular de acuerdo con la presente invención, con la tapa abierta y el segundo miembro retirado e invertido.

La **Figura 3a** ilustra una vista en perspectiva del primer miembro del aparato usado para preparar la suspensión celular de acuerdo con la presente invención.

35 La **Figura 3b** ilustra una vista en perspectiva desde atrás del primer miembro del aparato usado para preparar la suspensión celular de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 4** ilustra una vista en perspectiva de la base del aparato usado para preparar la suspensión celular de acuerdo con la presente invención.

Divulgación detallada de la invención

40 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entiende que la palabra "comprenden" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" implica la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

Descripción de las formas de realización preferidas

45 Teniendo en cuenta lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento para producir una suspensión celular transplantable de tejido vivo adecuada para injertar en un paciente, tal como se especifica en la reivindicación 1. Al aplicar el procedimiento, se recolectan las células adecuadas para reinjertar en un paciente y se dispersan en una solución que es adecuada para la dispersión inmediata sobre el sitio de injerto del receptor.

La invención objeto tiene muchas ventajas sobre la técnica anterior, algunas de las cuales se ilustran en los párrafos siguientes.

1. Proporciona un procedimiento eficiente en el tiempo para suministrar una cobertura celular en un tejido de piel en un contexto clínico. Es decir, las células están disponibles para cuando son necesarias en el momento de la cirugía. Esto se puede conseguir porque el periodo de preparación de las células es muy corto, de modo que se permite realizar el injerto perioperatoriamente o en las consultas de un médico especialista o un médico de cabecera.
 2. Proporciona un procedimiento que reduce significativamente la complejidad asociada con el uso de AEC convencionales y es particularmente útil en casos de lesión por quemadura que han acudido tarde. En algunos casos no se dispone de células en el momento de la cirugía, bien debido a un retraso en la remisión de un paciente con una quemadura sin curar o simplemente porque el tiempo necesario para el cultivo de los injertos ha superado el necesario para la preparación del lecho de herida del receptor. La presente invención mejora el problema del tiempo de preparación del injerto.
 3. Ayuda a la consecución de una rápida cobertura celular en áreas de lesión y sitios del donante. Proporciona un medio para reducir el tamaño de los puntos del donante, el sitio para la biopsia del donante es marcadamente menor que un sitio de donante para injerto de piel parcial y reduce o elimina el uso de sitios de donante para injerto de piel parcial; mejora la tasa de expansión de la cobertura celular; mejora el índice de curación de las quemaduras pequeñas; es útil para áreas pequeñas de reconstrucciones de piel, tal como cicatrices; y mejora la calidad de la cicatriz.
 4. Mejora los problemas asociados con el uso de soluciones usadas durante el procedimiento de cultivo tisular convencional. De acuerdo con el procedimiento de preparación, las células usadas en un injerto se suspenden en una solución de nutrientes sin suero xenogénico. A continuación, dicha suspensión se coloca directamente sobre el sitio del receptor.
 5. Proporciona un medio para el tratamiento de varios trastornos o enfermedades de piel. Por ejemplo, puede usarse para los siguientes: Rejuvenecimiento cutáneo, sustitución tras pérdida de piel, coincidencia del sitio durante la repigmentación de un área de piel, tratamiento de heridas posquemaduras, leucodermia, vitíligo, piebaldismo, en el tratamiento de cicatrices, por ejemplo causadas por una curación incorrecta de heridas, dirección incorrecta de la cicatriz o distorsión de la cicatriz por contracción de la herida, cicatrices de acné, dermoabrasión estéril para rejuvenecimiento, rejuvenecimiento tras tratamiento con láser y en asociación con reconstrucción dérmica. Adicionalmente, el procedimiento se puede usar para terapia de sustitución celular, incluido el tratamiento de sustitución de células epiteliales (tal como células uroteliales, células de la mucosa bucal y células epiteliales respiratorias) y tratamiento de sustitución de células endoteliales.
 6. Proporciona un medio para producir una suspensión de células en una proporción entre sí comparable con la de las observadas *in situ*. Es decir, debido al modo de preparación de la suspensión celular, las células, tales como células basales queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos y melanocitos, normalmente tienen mayores índices de supervivencia en comparación con las técnicas de cultivo tisular estándar, de modo que el cultivo celular puede tener como resultado la pérdida de ciertos tipos celulares. Esto tiene la ventaja de permitir la correcta repigmentación de la piel tras un injerto cutáneo.
 7. Permite una cirugía y curación más rápida, reduciendo de este modo el trauma para los pacientes durante la fase de su atención médica.
- De acuerdo con el primer aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para preparar una suspensión celular adecuada usar en el rejuvenecimiento y regeneración de tejido cutáneo dañado.
- De acuerdo con este procedimiento, el tejido (preferentemente de naturaleza autóloga) se obtiene de un paciente por medios de injerto tisular conocidos en la técnica. Preferentemente, esto se consigue obteniendo una biopsia de tejido. Durante la obtención de la biopsia se debe tener en cuenta la profundidad de la biopsia y el tamaño del área de superficie. El espesor y el tamaño de la biopsia influyen sobre la facilidad con la que se puede realizar el procedimiento y la velocidad con la que un paciente se recupera del procedimiento. En una forma muy preferida de la invención, el sitio del donante se escogerá de modo que coincida adecuadamente con el sitio del receptor, por ejemplo postauricular para cabeza y cuello, muslo para extremidades inferiores, parte interna del brazo para las extremidades superiores o palma de las manos para las plantas de los pies y viceversa.
- Una vez que se ha obtenido una biopsia de un paciente, la muestra de tejido se somete a medios de disociación físicos y/o químicos capaces de disociar el estrato celular en la muestra de tejido.

En el campo se conocen bien procedimientos para disociar las capas celulares dentro de los tejidos. Por ejemplo, el medio de disociación puede ser un medio de rotura física o química. Los medios de disociación física podrían

5 incluir, por ejemplo, raspado de la muestra de tejido con un escalpelo, trituración del tejido, separación de las capas mediante cortes físicos o perfusión del tejido. Los medios de disociación química podrían incluir, por ejemplo, digestión con enzimas, tales como tripsina, dispasa, colagenasa, tripsina-EDTA, termolisina, pronasa, hialuronidasa, elastasa, papaína y pancreatina. También se puede usar soluciones no enzimáticas para la disociación de tejido.

10 Preferentemente, la disociación de la muestra de tejido se consigue colocando la muestra en una solución enzimática precalentada que contiene una cantidad de enzima suficiente para disociar el estrato celular en la muestra de tejido. Esto se puede conseguir mediante, por ejemplo, el uso de una solución de tripsina, no obstante, para este fin se puede usar cualquier otra enzima, tal como dispasa, colagenasa, tripsina-EDTA, termolisina, pronasa, hialuronidasa, pancreatina, elastasa y papaína, que haga que las células se separen de otras células o de superficies sólidas. Cuando la enzima usada es tripsina, la solución enzimática usada en el procedimiento preferentemente no contiene calcio ni magnesio. Una de estas soluciones es, preferentemente, solución salina tamponada con fosfato libre de iones de calcio y de magnesio.

15 Para una biopsia tisular derivada de la piel de un paciente (que comprende células epiteliales-dérmicas), la cantidad de tripsina que podría usarse en el procedimiento es, preferentemente, entre aproximadamente 5 y 0,1% de tripsina por volumen de solución. Las concentraciones de tripsina deseables de la solución son aproximadamente de 2,5 a 0,25%, siendo la más preferida aproximadamente 0,5% de tripsina.

20 El periodo de tiempo durante el cual la muestra de tejido se somete a la solución de tripsina puede variar en función del tamaño de la muestra de biopsia tomada. Preferentemente, la muestra de tejido se introduce en presencia de la solución de tripsina durante un tiempo suficiente para debilitar las uniones cohesivas entre el estrato de tejido. Una muestra de tejido tomada de la piel de un paciente podría introducirse en tripsina durante un periodo de 5 a 60 minutos. Preferentemente, la muestra de tejido se sumerge en la solución de tripsina durante entre 10 y 30 minutos, siendo de 15 a 20 minutos óptimos para la mayoría de las muestras de tejido.

25 Una vez que la muestra de tejido se ha sumergido en la solución de tripsina durante un periodo adecuado de tiempo, se saca la muestra de la tripsina y se lava con la solución de nutrientes. Lavar la muestra de tejido puede implicar inmersión parcial o completa de la muestra tratada en la solución de nutrientes. Como alternativa, y más preferentemente, la solución de lavado se hace gotear sobre la muestra de tejido en un volumen suficiente para retirar y/o diluir significativamente cualquier exceso de tripsina de la superficie de la muestra. Preferentemente, cualquier dilución que se podrá producir conduciría a menos del 0,05% de tripsina en la solución de nutrientes.

30 La solución de nutrientes usada en el procedimiento podría reducir de forma significativamente y, más preferentemente, de eliminar el efecto de la tripsina mediante dilución o neutralización. La solución de nutrientes usada en el procedimiento tendrá, preferentemente, las características de (i) carecer de al menos suero xenogénico, (ii) ser capaz de mantener la viabilidad de las células hasta que se aplique a un paciente y (iii) ser adecuada para la aplicación directa e una región de un paciente sometido a injerto tisular. La solución puede ser cualquiera desde una solución de sales básicas hasta una solución de nutrientes más compleja. Preferentemente, la solución de nutrientes carece de todo suero, pero contiene varias sales que simulan las sustancias encontradas en los fluidos corporales; este tipo de solución a menudo se denomina solución salina fisiológica. El fosfato u otras sustancias no tóxicas pueden también tamponar la solución con el fin de mantener el pH a aproximadamente niveles fisiológicos. Una solución de nutrientes particularmente preferida es la solución de Hartmann.

40 Tras la aplicación de la solución de nutrientes a la muestra de tejido, el estrato celular de la muestra se separa, permitiendo extraer las células capaces de reproducirse del material celular y suspenderlas en la solución de nutrientes. Es preferible separar la dermis y la epidermis para permitir el acceso a la unión dermo-epitelial de ambas superficies.

45 A continuación, las células capaces de reproducirse se extraen del estrato separado por cualquier medio conocido en la técnica. Preferentemente, las células reproductoras se raspan de la superficie del estrato usando un instrumento, tal como un escalpelo. Las células capaces de reproducirse dentro de la unión dermo-epitelial incluyen, entre otras, células basales queratinocitos, células de Langerhans, fibroblastos y melanocitos. Tras la liberación de las células de la muestra de tejido, se suspenden en la solución de nutrientes. Preferentemente, sólo un pequeño volumen de solución de nutrientes se aplica a la muestra de tejido durante esta etapa de recogida, de lo contrario la suspensión puede convertirse en demasiado fluida, lo que dificultaría la aplicación de la suspensión al injerto.

50 Para evitar conglomerados celulares excesivamente grandes en la suspensión celular, preferentemente la suspensión se filtra. En esta etapa preferida de la invención se puede usar cualquier filtro capaz de separar conglomerados celulares excesivamente grandes de la suspensión. En una forma muy preferida de la invención, el tamaño del filtro

está entre 50 μm y 200 μm . Más preferentemente, está entre 75 μm y 150 μm , siendo 100 μm un ejemplo específico.

Antes de la aplicación en el sitio del injerto o inmediatamente después de filtrar, la suspensión celular puede diluirse para producir una densidad celular apropiada adecuada para el fin para el que se va a usar la suspensión.

5 De acuerdo con el segundo aspecto de la invención se proporciona una suspensión celular acuosa, producida de acuerdo con el procedimiento descrito en el primer aspecto de la invención, para usar en el tratamiento de pacientes que requieren cirugía de injerto cutáneo. La suspensión celular proporcionada por este procedimiento es muy adecuada para la regeneración tisular y técnicas de injerto. Una ventaja importante de usar dicha suspensión en la tecnología de injertos es que se puede usar para expandir considerablemente el área o volumen de una herida que se puede tratar rápidamente mediante multiplicación *in situ* de un número limitado de células. El número y la concentración de células sembradas sobre un sitio de injerto pueden variarse modificando la concentración de las células en suspensión o modificando la cantidad de suspensión que se distribuye sobre un área o volumen dado del sitio del injerto.

15 Suspendiendo las células en una solución de nutrientes que al menos (i) carezca de suero xenogénico, (ii) sea capaz de mantener la viabilidad de las células hasta que se aplique a un paciente y (iii) sea adecuada para la aplicación directa en una región de un paciente sometido a injerto tisular, los inventores han encontrado que se mejora el resultado de los injertos de piel del paciente. Una explicación parcial de esto parece atribuirse a la eliminación de suero xenogénico y, más preferentemente, de todo el suero de la suspensión celular. El suero xenogénico es un aditivo común en el medio de cultivo del injerto y se sabe bien que produce posibles problemas infecciosos e hipersensibilidad. No obstante, dicho suero normalmente se requiere para la expansión *in vitro* de las células y para neutralizar la acción de la enzima si la enzima usada es tripsina. La solución de nutrientes usada en la presente invención no requiere dicho suero porque la población celular en la suspensión no se ha expandido antes de la aplicación al sitio del injerto. Se estimula bastante multiplicación celular sobre el paciente en lugar de en un sistema *in vitro*. Cuando se usa tripsina, la neutralización se consigue por otros medios.

25 Otra característica única de la suspensión celular producida de acuerdo con el procedimiento del primer aspecto de la invención es que la composición de células en la preparación celular es comparable con la observada *in situ* en comparación con la preparación celular de la técnica anterior. Una posible explicación para ello es que en la técnica anterior, El cultivo de la preparación celular usa cultivo selectivo para queratinocitos, por tanto, se produce pérdida de constituyentes celulares, como fibroblastos y melanocitos, mientras que la suspensión celular producida a partir del primer aspecto de la invención tiene una composición celular comparable a la de la población celular *in situ*. Otra característica de la suspensión celular producida a partir del primer aspecto de la invención es que las células del injerto son más viables, ya que se recolectan en una solución de nutrientes distinta a los procedimientos de recogida de células de la técnica anterior que usan técnicas en las que las células se recolectan mientras están expuestas a las potentes enzimas digestivas durante periodos de tiempo excesivos. Cuando las células se exponen a dichas enzimas durante periodos de tiempo excesivos, la viabilidad de la suspensión celular disminuye.

La invención permite el tratamiento de pacientes que requieren un injerto de tejido cutáneo. Mediante este procedimiento, la suspensión celular producida de acuerdo con el primer aspecto de la invención se aplica a un sitio de injerto. Una suspensión líquida que contiene células se puede distribuir manualmente sobre el sitio del injerto mediante varias técnicas, que incluyen pulverización, extensión, pipeteo y pintado.

40 En una forma muy preferida de la invención, la suspensión se va a pulverizar sobre un sitio de injerto. La suspensión se puede pulverizar mediante cualquier tipo de boquilla que transforma líquido en pequeñas gotas que se transmiten por el aire. Esta realización es objeto de dos restricciones. En primer lugar, no debe someter a las células en solución a fuerzas de cizalladura o a presiones que dañarían o matarían un número sustancial de células. En segundo lugar, no debe requerirse que la suspensión celular se mezcle con un fluido propelente que es tóxico o perjudicial para las células o lechos de heridas. Diversas boquillas disponibles habitualmente satisfacen ambas restricciones. Dichas boquillas se pueden conectar mediante cualquier medio convencional a un reservorio que contiene la suspensión celular.

Como alternativa, la suspensión se puede liberar mediante una pipeta, "cuentagotas" habituales, jeringuilla y aguja y/u otros dispositivos similares para colocar cantidades pequeñas de suspensión celular sobre un sitio de injerto.

50 Una vez que la suspensión celular se ha aplicado al sitio de injerto del receptor, la herida puede vendarse con un vendaje para heridas. En una realización preferida, el vendaje es Surfsoft™, un vendaje de nylon tejido. Preferentemente, la curación de la herida se vigila mediante protocolos estándar para tratamientos de injertos cutáneos conocidos por los expertos en la técnica.

Un aparato para desarrollar una solución para regeneración tisular tiene un medio de calentamiento adecuado para calentar una solución enzimática hasta una temperatura requerida y para mantener dicha solución a la temperatura deseada durante una cantidad de tiempo adecuado; y un rebaje de filtro que comprende un medio de filtro capaz de separar congregados celulares grandes de una suspensión celular.

5 En una forma preferida, el aparato también incluye:

un reservorio capaz de retener una muestra de tejido y una solución de nutrientes, en el que dicha solución también puede mantener la viabilidad de las células en la muestra de tejido. Más preferentemente, el reservorio tiene un tamaño suficiente para permitir la manipulación de la muestra de tejido, lo que permite la separación del estrato celular del tejido y la recolección de las células del estrato adecuadas para injertar.

10 El aparato puede también incluir uno o más pocillos de contención de fluidos para almacenamiento de fluidos, tal como la solución de nutrientes. Los pocillos pueden servir, como alternativa, como receptáculo de un contenedor, tal como un vial de plástico o cristal que contiene la solución de nutrientes. Preferentemente, el pocillo puede contener al menos un volumen de 10 ml. Dichos pocillos permiten la fácil aplicación de fluidos en la muestra de tejido. El almacenamiento de dichos fluidos en estrecha proximidad con su punto de aplicación también proporciona la ventaja de reducir el riesgo de fugas accidentales del fluido y proporciona un medio sencillo para acceder al fluido para liberarlo con precisión sobre la muestra de tejido o la suspensión celular.

En una forma muy preferida, el aparato comprende un primero y un segundo miembro, en el que:

(1) el primer miembro incluye:

20 (a) al menos un medio de calentamiento adecuado para calentar una solución enzimática hasta una temperatura requerida y que sea capaz de mantener dicha solución a la temperatura deseada durante una cantidad de tiempo adecuado;

(b) al menos un rebaje de filtro que comprende un medio de filtro capaz de separar congregados celulares grandes de una suspensión celular;

(c) al menos un pocillo de contención de fluidos para almacenamiento de la solución de nutrientes;

25 (2) el segundo miembro forma un reservorio capaz de contener una muestra de tejido y la solución de nutrientes en el contenedor de fluidos; y

en el que el primer miembro proporciona un asiento sobre el que se puede colocar el segundo miembro durante la manipulación del tejido.

30 En una forma preferida adicional, el primer miembro proporciona un compartimento de almacenamiento en el que se pueden almacenar las herramientas y soluciones usadas en el procedimiento descrito anteriormente. Cuando dicho compartimento se proporciona en el aparato, el segundo miembro puede proporcionar la tapa o cierre de dicho compartimento. En uso, la tapa se retira preferentemente de la parte superior del compartimento y se invierte. La parte inferior de la tapa forma, preferentemente, el reservorio en ella, que permite que el segundo miembro tenga un fin doble. Se puede acceder a las herramientas y soluciones usadas en el procedimiento desde el compartimento. La tapa invertida puede asentarse de nuevo sobre el compartimento proporcionando el reservorio del aparato.

El aparato puede estar fabricado de metal, plástico o cualquier otro material. Además, el contenedor puede tener cualquier tamaño. Preferentemente, el tamaño del contenedor sólo está limitado por su uso previsto y la necesidad de esterilización, como mediante el uso de irradiación gamma y/u óxido de etileno.

40 Debe apreciarse que el medio de calentamiento empleado en el aparato puede simplemente constituir una lámina o láminas de calentamiento en la parte superior del primer miembro. No obstante, existen problemas con dichas disposiciones, la menor de las cuales no es la posibilidad de derrame accidental del contenedor sometido a calentamiento. Por tanto, en una realización, uno o más medios de calentamiento pueden estar alojados dentro de un rebaje en el primer miembro. También localizado dentro de dicho rebaje está al menos un contenedor en el que se puede introducir el tejido para su exposición a la solución enzimática. En una realización alternativa, uno o más medios de calentamiento pueden estar alojados en la base del aparato. En dicha configuración, el primer miembro contiene al menos una abertura adecuada para recibir un contenedor capaz de contener fluidos, en el que la abertura proporciona acceso para el contenedor al medio de calentamiento.

50 Se apreciará que, si el aparato está diseñado para más de un uso, el medio de calentamiento puede ser capaz de calentarse y enfriarse repetidamente. Como alternativa, cada unida de calentamiento puede ser para un solo uso,

pero se pueden proporcionar múltiples unidades de calentamiento con el aparato para facilitar múltiples sucesos de calentamiento.

5 En una configuración altamente preferida del aparato, un collar de calentamiento se localiza dentro de un rebaje en el mismo, formando un rebaje de calentamiento en el primer medio en el que se localiza un contenedor (p. ej., un vial) para la enzima. Preferentemente, el contenedor se sujeta en su lugar a través de, al menos, un medio de sujeción que, deseablemente, rodea la parte de la porción superior del contenedor e impide la liberación accidental del contenedor del aparato. En las circunstancias en las que el aparato está destinado para un solo uso, el medio de sujeción puede estar formado como parte integral del primer miembro, lo que significa que la retirada del contenedor sólo se puede conseguir rompiendo físicamente el primer miembro.

10 El medio de calentamiento usado en el aparato se controla, preferentemente, con un circuito que permite la activación del elemento de calentamiento cuando se requiera. Por ejemplo, el medio de calentamiento se puede poner en funcionamiento oprimiendo el botón de inicio localizado en, por ejemplo, la superficie del primer miembro. Como alternativa, el medio de calentamiento se puede activar empujando hacia abajo el contenedor con la suficiente fuerza como para activar un interruptor colocado en la base del aparato. Un experto de la técnica en el campo apreciará que se puede usar un amplio abanico de medios electrónicos para activar la unidad de calentamiento integrada en el aparato.

15 Deseablemente, la unidad de calentamiento está unida operablemente a un mecanismo cronómetro, que está adaptado para calentar la solución enzimática durante un periodo de tiempo predefinido. En las circunstancias en las que el aparato está destinado a múltiples usos, preferentemente se puede fijar el cronómetro para desactivar el elemento de calentamiento cuando se alcance una cantidad de tiempo concreta. Momento en el cual, una alarma se puede activar para informar al usuario de que se ha acabado el tiempo. La alarma puede ser audible o tener forma de un visualizador lumínico.

20 En una configuración preferida adicional, el medio de calentamiento se puede proporcionar con un control de temperatura ajustable. Cuando se requiere ajustar la temperatura, dicha variación se puede conseguir adaptando el circuito de control de calentamiento para incluir o comunicar un mecanismo de control de la temperatura que permita que la temperatura de la unidad de calentamiento se varíe constantemente dentro de un intervalo constante o puede presentar un intervalo de las temperaturas seleccionadas a las que se puede fijar el medio de control del calentamiento. De forma beneficiosa, en el aparato se incluirá un medio de control de la temperatura, en el que el aparato se va a usar en la recolección y preparación de diferentes tipos celulares y/o en el que se usan diferentes enzimas en el procedimiento de recolección para el que el aparato tiene una aplicación única.

25 En una forma alternativa más preferida, el aparato está diseñado para un solo uso. En estos casos, el mecanismo cronómetro es parte del circuito que controla el medio de calentamiento. Una vez que el medio de calentamiento se ha activado, calienta la solución durante un periodo de tiempo predefinido y después se autodestruye. Los expertos en la técnica apreciarán que un aparato de este tipo puede estar equipado con varios medios de monitorización que pueden indicar: La enzima ha alcanzado la temperatura requerida; la cantidad de tiempo durante el cual la enzima ha estado en la solución; y/o la cantidad de tiempo restante antes de que el circuito se autodestruya etc. A modo de ejemplo únicamente, el medio de monitorización podría consistir en una serie de LED que activen ciertos sucesos. En una realización altamente preferida, el medio de calentamiento permanece, preferentemente, en modo calentamiento durante un máximo de 45 minutos a 1 hora.

30 El medio de calentamiento puede estar alimentado por cualquier medio conocido en la técnica. Preferentemente, la alimentación se proporciona por pilas/baterías. En una forma, la fuente de alimentación es una batería y una pluralidad de baterías que se localizan en la base del aparato.

35 En una forma adicional, el aparato puede disponer de uno o más medios para facilitar la mezcla de las soluciones usadas en la invención, tal como una solución enzimática. A este respecto, y a modo de ejemplo únicamente, el aparato puede incluir un medio para agitar en vórtex la solución; tal como un sistema electromagnético que está adaptado para agitar una perla magnética. Cuando el aparato incluye un sistema de mezcla electromagnético, la perla magnética se proporciona, preferentemente, en el contenedor (p. ej., un vial) en el que la solución se almacena en el aparato. Como alternativa, la perla magnética se puede añadir a la solución cuando se desea mezclar.

40 En una forma altamente preferida, el medio de mezclado se combina con el medio de calentamiento bien en forma de una única unidad o en unidades separadas para facilitar el calentamiento constante de la solución de un modo uniforme. El uso de dicho medio de mezclado evita el posible sobrecalentamiento de la solución más cercana a la unidad de calentamiento mientras la solución se calienta. Tal sistema proporcionará un calentamiento más constante de la solución. En la técnica se conocen medios alternativos para el mezclado de la solución e incluirán, medios mecánicos, físicos, eléctricos y electromagnéticos, como ejemplo. Aunque se puede emplear cualquier

medio de mezclador en el aparato, el medio de mezclado se selecciona, preferentemente, para minimizar la vibración del aparato o está incorporado en el aparato de modo que minimice dicha vibración. A este respecto, el medio de mezclado puede estar alojado en uno o más amortiguadores de vibración o el aparato puede incluir uno o más amortiguadores de vibración en su base.

5 Cuando un medio de mezclado está incorporado en el aparato, el medio se puede activar automáticamente tras la activación de la unidad de calentamiento o, como alternativa, puede haber un sistema de activación aparte. Además, la velocidad del mezclado puede ser fija o variable. Preferentemente, hay un sistema de activación aparte para el medio de mezclado.

10 El rebaje del filtro incorporado en el aparato puede ser de cualquier tamaño o forma de modo que facilite la filtración de una suspensión celular. Además, el rebaje puede estar adaptado para recibir y sujetar al menos un tubo en el cual la suspensión celular puede filtrarse. Preferentemente, el rebaje tiene una base cónica que proporciona un medio sencillo de acceder al volumen total de la suspensión celular después de que se haya filtrado.

15 Deseablemente, el tercer rebaje está diseñado para alojar un filtro celular de 100 μm . El tercer rebaje puede acomodar un filtro celular de 100 μm conectado a un tubo cónico. Preferentemente, el tubo tiene graduaciones de área/volumen marcadas en el lateral.

20 El aparato puede también incluir un grupo de herramientas requeridas para la recolección de células. Los expertos en la técnica apreciarán que se puede incluir en el dispositivo cualquier herramienta necesaria para recolectar células. Preferentemente, el grupo de herramientas están estériles. Sólo como ejemplo, el grupo de herramientas puede incluir un vaso de cristal de separación de enzimas; una solución estéril para una suspensión de la enzima; una solución de nutrientes estéril; escalpelo; pinzas; jeringa; cuentagotas de medicina; filtro celular; vendajes para heridas y/o boquillas de pulverización. En una forma altamente preferida, el grupo de herramientas se almacena en un compartimento formado en el primer miembro del aparato, que está cubierto por el segundo miembro cuando no está en uso.

25 En una realización altamente preferida, el dispositivo se usa para recolectar una suspensión de células y aplicar las células a un sitio del receptor del siguiente modo.

30 Un alícuota de agua estéril se mezcla con una porción de enzima de separación liofilizada y se coloca en el rebaje de calentamiento. A continuación se activa el medio de calentamiento, que calienta el contenido (es decir, la solución enzimática) del contenedor hasta una temperatura de trabajo de entre 30 y 37 $^{\circ}\text{C}$, preferentemente entre 33 y 37 $^{\circ}\text{C}$ y, a modo de ejemplo, de 37 $^{\circ}\text{C}$ en 2 minutos y mantiene la temperatura de trabajo durante al menos 45 minutos. Una vez que se ha alcanzado la temperatura de operación, una muestra de tejido tomada de un sitio de donante se introduce en la solución enzimática y se incuba a la temperatura de trabajo. La muestra de tejido se incuba durante entre 5 y 45 minutos. Los expertos en la técnica apreciarán que el tiempo tomado para alcanzar la separación de las capas de la muestra de tejido depende del espesor y el tamaño de la muestra de tejido y de la temperatura de incubación. Una vez que se ha alcanzado la separación enzimática de las capas de tejido, se retira la muestra de tejido hasta el reservorio y las capas de tejido se separan usando instrumento(s) quirúrgico(s).

35 Un alícuota de la segunda solución cuidadosamente medido se extrae después del pocillo contenedor de fluidos mediante aspiración en una jeringa y después se aplica a las capas. Se raspan las células entre las capas y se suspenden mediante mezclado con la solución de nutrientes. A continuación, se recolecta la suspensión celular, preferentemente usando una jeringa y una cánula.

40 La suspensión de células recolectada se pasa después a través de un filtro para células localizado en el rebaje del filtro y la suspensión filtrada de células se recolecta en el rebaje del filtro. Opcionalmente, el reservorio se puede aclarar con un volumen adicional de la segunda solución y esta suspensión de células resultante también se puede filtrar y recolectar en el rebaje del filtro.

45 A continuación, la suspensión celular filtrada se puede aspirar opcionalmente en una jeringa y aplicar al sitio del receptor.

Ejemplo 1

Preparación del sitio del receptor

50 Para optimizar el éxito del injerto cutáneo, se limpió la herida y se evaluó que fuera de la profundidad adecuada. Además, se estableció hemostasis sanguínea y se comprobó la herida para detectar signos de celulitis o infección en las zonas adyacentes. Las técnicas para preparar el área incluyeron disección aguda, dermoabrasión o rejuvenecimiento con láser.

Biopsia del sitio del donante

El sitio del donante se escogió de modo que coincidiera adecuadamente con el sitio del receptor. El sitio del donante se infiltró con anestesia local y adrenalina debajo de la piel, cerca del tejido subcutáneo. Esto permitió que el sitio del donante estuviera firme y ayudó a tomar la biopsia fina de espesor parcial. Las dimensiones de la biopsia se determinaron mediante el tamaño del área de superficie del sitio del receptor que se va a cubrir. Normalmente, el tamaño de la biopsia tiene una proporción de expansión de 1:10 - 1:80. En este caso, un tamaño de la biopsia 2 cm x 2 cm se tomó del sitio del donante, dando una proporción de expansión de 1:60.

Rejuvenecimiento celular usando la técnica rápida

El tratamiento de la herida se llevó a cabo usando el aparato de recolección celular de la técnica rápida Re-Cell®, que se explica con más detalle en el ejemplo 2 que se expone a continuación. El aparato contenía todos los instrumentos, soluciones, enzimas y vendajes requeridos para el tratamiento de heridas.

El elemento de calentamiento se activó oprimiendo el “botón de inicio”. La solución (agua estéril para inyectables) (10 ml) se transfirió desde el vaso de plástico suministrado marcado como Solución A a un vaso de cristal que contiene la enzima de separación (tripsina liofilizada), para dar una concentración final de tripsina al 0,5%. La solución enzimática se mezcló después, se transfirió a un vaso ya localizado en el rebaje del elemento de calentamiento y se calentó hasta 37 °C.

El vaso que contenía la Solución B (medio de nutrientes) se transfirió desde su vaso suministrado en el pocillo de contención de fluidos.

Después, la muestra de tejido previamente obtenida se introdujo en la solución enzimática y se incubó a 37 °C durante entre 10 y 15 minutos. Después de este tiempo, se sacó la muestra de tejido de la solución enzimática con un par de pinzas, se aclaró sumergiéndola en el pocillo de contención de fluidos que contenía la Solución B y se colocó con el lado dérmico hacia abajo y el lado epidérmico hacia arriba en el reservorio.

Después, se aspiró la solución B desde el pocillo a la jeringa y se aplicó mediante goteo desde la jeringa sobre ambas capas de la biopsia.

Las capas de piel se separaron usando pinzas. Esto permitió el acceso a la zona de unión dermis-epidermis de ambas superficies. Se rasparon las células de las superficies para desarrollar una columna de células en el reservorio. Después, las células se mezclaron en la Solución B. La columna de células se extrajo con la jeringa, a través de una cánula de calibre 1,016 mm.

El filtro suministrado (100 µm del filtro para células) se fijó en el rebaje del filtro y la columna de células de la Solución B se pasó después a través del filtro. Se usó después una cantidad pequeña de Solución B para aclarar el reservorio (p.ej. un plato de Petri) y para recoger las células sobrantes, que también se pasaron a través del filtro.

La suspensión de células resultante recolectadas en el rebaje cónico se aspiró en la jeringa, se fijó una boquilla a la jeringa para pulverizar o gotear sobre el área herida.

La herida se volvió a comprobar para garantizar que estaba limpia y libre de residuos y para comprobar la ausencia de signos de contaminación bacteriana. Además, la herida se comprobó para determinar si se había conseguido hemostasia. Una vez preparado el sitio del receptor, se aplicó la suspensión de células a la superficie de la herida usando la boquilla.

La herida se cubrió con Surfsoft™, un vendaje de nylon tejido, que se suministró con el aparato. La curación de la herida se vigiló usando los protocolos estándar de tratamiento de injertos cutáneos.

Ejemplo 2

La realización mostrada en la figura uno está dirigida a un aparato de recolección celular Re-Cell® Rapid Technique 10 para usar en la producción de una suspensión celular transplantable de tejido vivo adecuado para injertar en un paciente.

Como se ilustra en la Figura 1, el aparato incluye una tapa de cierre 12 que posee un mecanismo de bloqueo 14 adaptado para enganchar de forma extraíble una porción de base 16. El mecanismo de bloqueo 14 proporciona un medio de cierre del aparato 16 cuando no se está usando. Localizado en la porción de base 16 hay un primer miembro 18 dentro del cual se proporciona una abertura 20 en la cual se localiza un vial 22 para la enzima. Adyacente a la abertura se proporciona un interruptor de activación 24 capaz de activar el medio de calentamiento (no mostrado). El primer miembro también proporciona un pocillo de contención de fluidos 26 y un rebaje del filtro

28. Como se presenta en esta ilustración, el filtro 29 se muestra localizado en el rebaje del filtro. Habitualmente, el filtro es un elemento opcional incluido como un elemento aparte en el aparato.

5 La abertura 20 en el primer miembro 18 es, deseablemente, de un diámetro tal que permite que el cuello del vial 22 protruya a través y por encima del primer miembro 18. La periferia de la abertura 20 está provista de un collar 21 que es ligeramente más pequeño que el diámetro del cuerpo del vial 22. Por tanto, durante el uso, el vial 22 no se puede extraer del aparato 10, ya que está sujeto en su lugar por el collar 21 localizado alrededor de la periferia de la abertura 20.

10 Localizado adyacente a la abertura 20, el pocillo de contención de fluidos 26 y el rebaje del filtro 28 es el segundo miembro 30 que está colocado sobre un asiento (no mostrado) localizado dentro de un compartimento de almacenamiento (no mostrado) dentro del primer miembro 18. Cuando se invierte, el segundo miembro 30 forma un reservorio dentro del cual se pueden realizar manipulaciones del tejido. Para facilitar la separación del segundo miembro 30 del primer miembro 18 se proporciona una indentación 32 en el lateral de una porción del segundo miembro 30, que es de un tamaño tal que una persona puede levantar el segundo miembro del asiento sobre el que yace en el primer miembro 18.

15 Dentro del rebaje del filtro 28 se localiza un filtro 29 (proporcionado por separado con los otros componentes) que tiene una malla capaz de separar material celular de más de 100 μm de un sobrenadante celular.

20 La Figura 2 proporciona una vista en perspectiva en despiece ordenado del aparato 10, en el que el segundo miembro 30 se extrae del primer miembro 18 y se invierte. La inversión del segundo miembro 30 revela las paredes laterales 32 del segundo miembro 30, que forman la barrera de contención de fluidos del reservorio y un área de reservorio 34 en la que se pueden realizar las manipulaciones del tejido.

25 La extracción del segundo miembro 30 del primer miembro 18 revela un compartimento de almacenamiento 36 en el primer miembro 18, en el que las soluciones y herramientas se pueden almacenar cuando el aparato 10 no se está usando. Dentro del compartimento de almacenamiento 36 se localiza un asiento 38 sobre el cual puede residir el segundo miembro 30. El asiento 38 se localiza, preferentemente, alrededor de la periferia del compartimento de almacenamiento 36 a una profundidad debajo de la superficie del primer miembro 18 que es equivalente a la altura de las paredes laterales 32 del segundo miembro 30.

30 La figura 3a proporciona una vista en perspectiva del primer miembro 18 que muestra el compartimento de almacenamiento 36, el interruptor de activación del calentador 24, la abertura 20, el pocillo de contención de fluidos 26 y el rebaje del filtro 28 formado dentro del primer miembro. La figura 3b proporciona una vista desde atrás del primer miembro 18 que muestra el rebaje del filtro 28, el pocillo de contención de fluidos 26, el interruptor de activación del calentador 24, el collar de abertura 21 y la pared trasera del compartimento de almacenamiento 36. Como se observa en esta figura, el rebaje del filtro tiene una base cónica, de modo que proporciona un medio para el acceso fácil a la suspensión celular que se filtra en él. Localizado adyacente al pocillo de contención de fluidos y en el lado opuesto del pocillo de contención del filtro, se proporciona un miembro de posicionamiento de batería 14 que sale hacia la base 16 del aparato (no mostrado) y proporciona un medio para sujetar las baterías en su lugar, lo que se requiere para activar el medio de calentamiento.

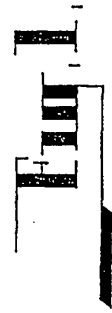
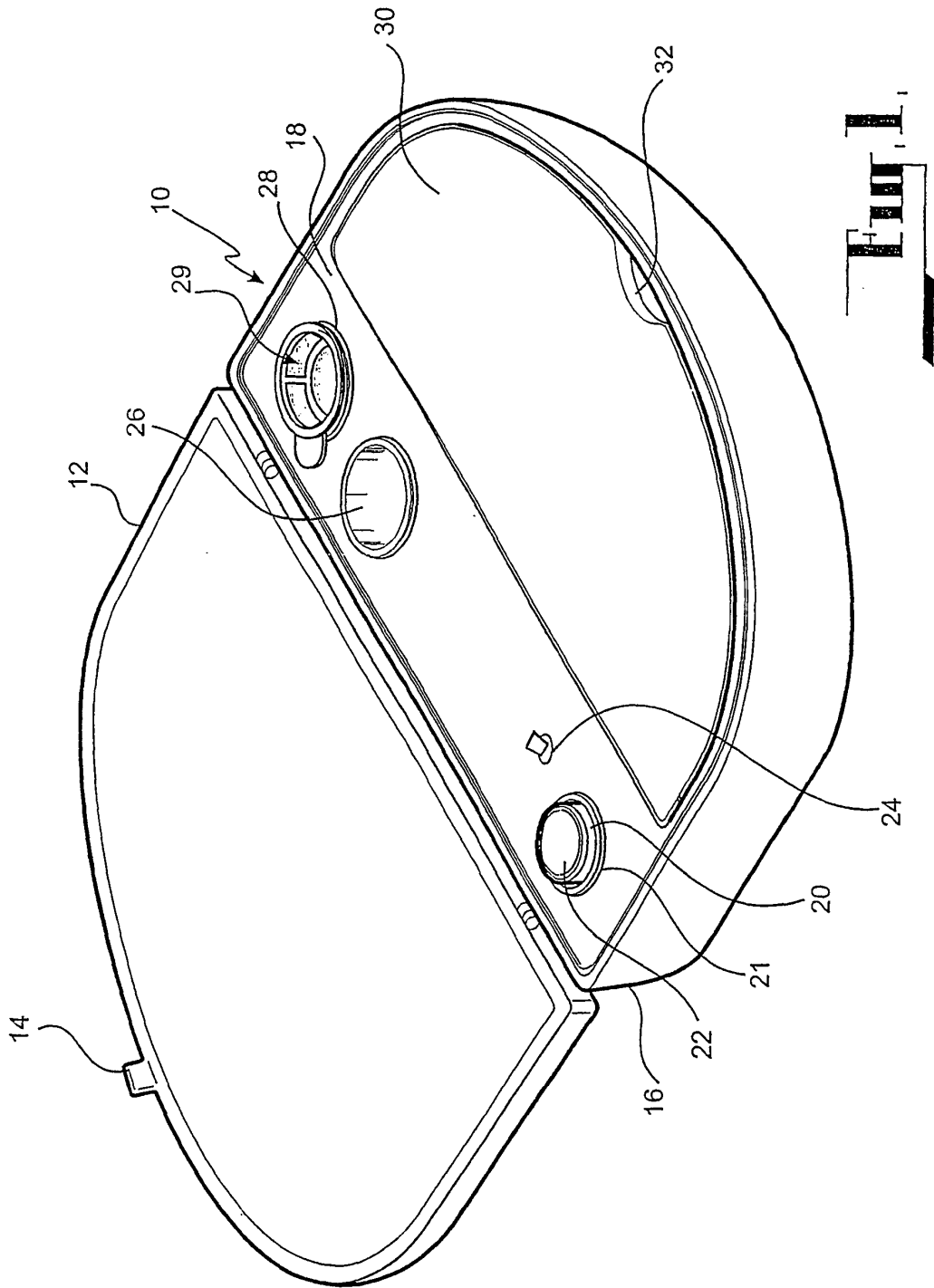
40 La figura 4 proporciona una vista en perspectiva de la base 16 del aparato 10 que muestra el vial 22 localizado dentro de un campo de contención 42. Entre el campo de contención 42 y el vial 22 se localiza un collar(es) de calentamiento 44, que rodea el cuerpo del vial. Adyacente al campo de contención hay una placa de circuitos 46, que se mantiene en su posición por un medio de contención de placa de circuitos 48, 50 y 52. Dicha placa de circuitos 46 está en comunicación eléctrica con el collar(es) de calentamiento 44 por cables 54. Asimismo, la placa de circuitos también está en comunicación eléctrica mediante cables 58 con el interruptor de activación del calentador (no mostrado). Adyacente a la placa de circuitos 46 se proporciona un medio de contención de pilas 58, que sujeta las pilas 4AA en una posición de inmovilización (no mostrado) Las pilas están en comunicación eléctrica con la placa de circuito 46 por cables 60. Cuando el primer miembro 18 está colocado en la base 16, las pilas se mantienen en su lugar por el medio de contención de pilas 58, el medio de posicionamiento de pilas 40 y la base de cada uno de los pocillos de contención de fluidos 26 y el rebaje del filtro 28 Preferentemente, la base cónica del rebaje del filtro 28 también sale entre las pilas, proporcionando otro medio para asegurar las pilas en posición de inmovilización.

50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar una suspensión celular adecuada para la aplicación a un paciente, procedimiento que comprende las etapas de:
- 5 (a) someter una muestra de tejido cutáneo, incluidas células adecuadas para injertar a un paciente, a al menos un medio de disociación física y/o química capaz de disociar el estrato tisular en la muestra de tejido de piel durante tiempo suficiente para debilitar las fuerzas cohesivas entre el estrato tisular, en el que la muestra de tejido cutáneo comprende dermis, epidermis y unión dermis-epidermis entre ellas.
- 10 (b) extraer la muestra de tejido cutáneo del medio de disociación usado en la etapa (a) y recolectar en presencia de una solución de nutrientes las células de la muestra de tejido cutáneo, las células adecuadas para injertar en un paciente, en el que la solución de nutrientes (i) carece de suero xenogénico, (ii) es capaz de mantener la viabilidad de las células hasta que se aplique a un paciente y (iii) es adecuada para la aplicación directa e una región de un paciente sometido a injerto tisular; y
- (c) filtrar la suspensión celular producida de acuerdo con la etapa (d) para eliminar conglomerados celulares grandes;
- 15 en el que el procedimiento no comprende las etapas de sedimentar y resuspender las células.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio de disociación química es una enzima capaz de romper las uniones celulares.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la enzima es tripsina, tripsina-EDTA, enzima similar a la tripsina, dispasa, colagenasa, termolisina, pronasa, hialuronidasa, pancreatina, elastasa y/o papaína.
- 20 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tiempo para debilitar las fuerzas cohesivas entre el estrato tisular de la etapa (a) es de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 60 minutos.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tiempo para debilitar las fuerzas cohesivas entre el estrato tisular de la etapa (a) es de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 20 minutos.
- 25 6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución de nutrientes es solución de Hartmann.
7. La suspensión celular obtenible mediante un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un paciente que necesite cirugía de injerto cutáneo, en la que la suspensión celular comprende células capaces de reproducirse, incluidas células basales queratinocitos, melanocitos y fibroblastos, en la que las células están en una proporción entre sí comparable con la observada *in situ*.
- 30 8. La suspensión celular para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la suspensión comprende células autólogas al paciente.
9. Una suspensión celular para su uso en el tratamiento de un paciente que necesite cirugía de injerto cutáneo, en la que la suspensión celular se prepara de acuerdo con las etapas siguientes:
- 35 (a) someter una muestra de tejido cutáneo, incluidas células adecuadas para injertar a un paciente, a una enzima adecuada para disociar las piezas cohesivas del estrato tisular en la muestra de tejido cutáneo, en el que la muestra de tejido cutáneo comprende dermis, epidermis y unión dermis-epidermis entre ellas.
- (b) extraer la muestra de tejido cutáneo de la solución enzimática usada en la etapa (a) y recolectar en presencia de una solución de nutrientes las células de la muestra de tejido cutáneo, en la que las células son adecuadas para injertar a un paciente, en el que la solución de nutrientes (i) carece de suero xenogénico, (ii) es capaz de mantener la viabilidad de las células hasta que se aplique a un paciente y (iii) es adecuada para la aplicación directa e una región de un paciente sometido a injerto tisular.
- 40 (c) filtrar la suspensión celular producida de acuerdo con la etapa (d) para eliminar conglomerados celulares grandes;
- 45 en la que la suspensión celular comprende células capaces de reproducirse, incluidas células basales queratinocitos, melanocitos y fibroblastos, en la que las células están en una proporción entre sí comparable a la observada *in situ*.

10. La suspensión celular para el uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la solución de nutrientes es solución de Hartmann.



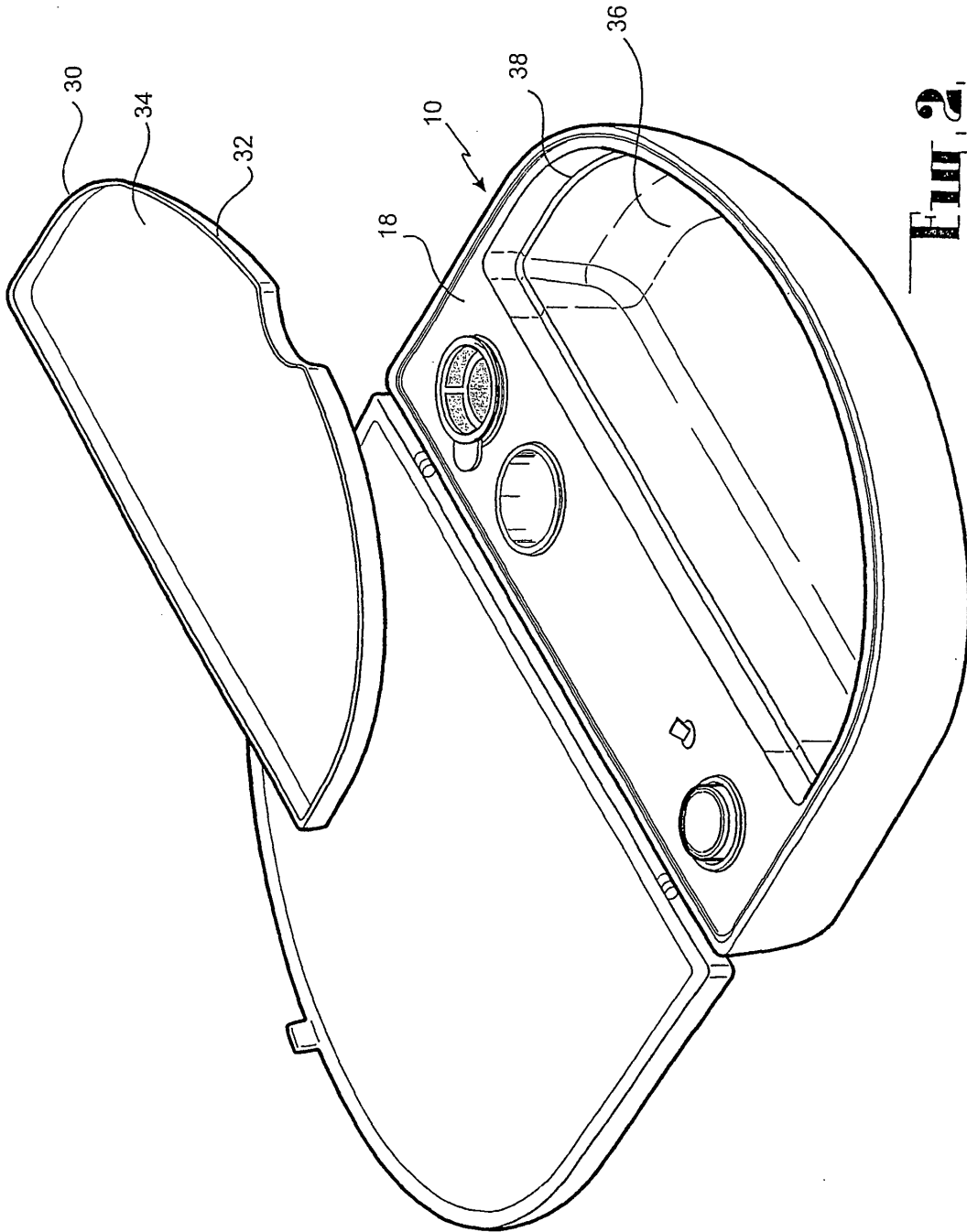


FIG. 2

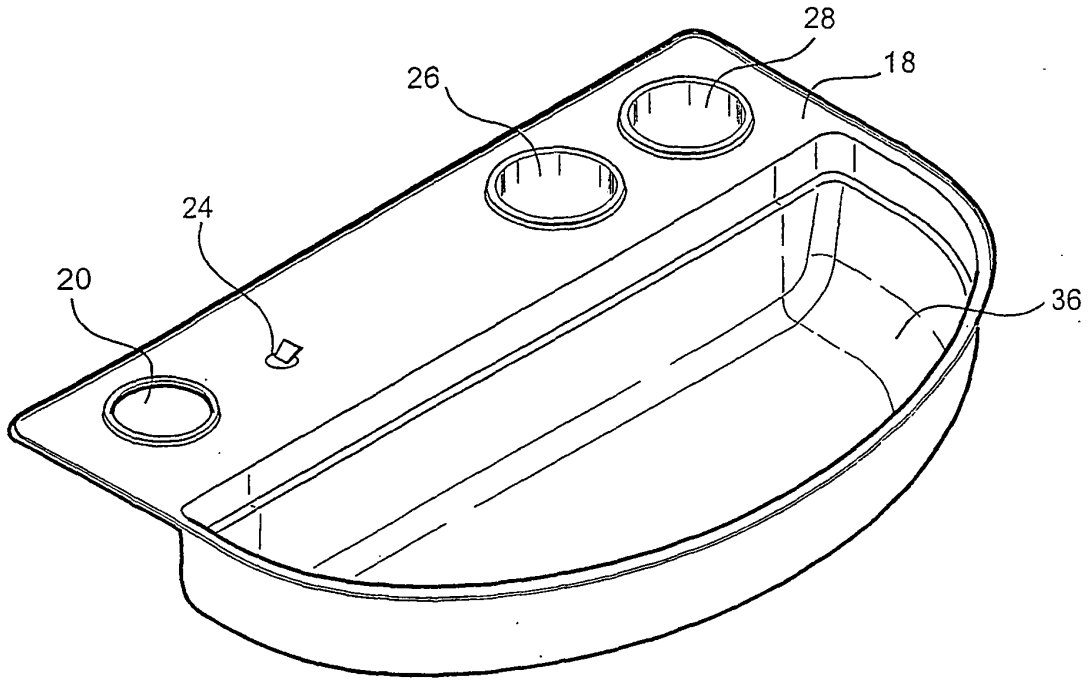


Fig. 3a.

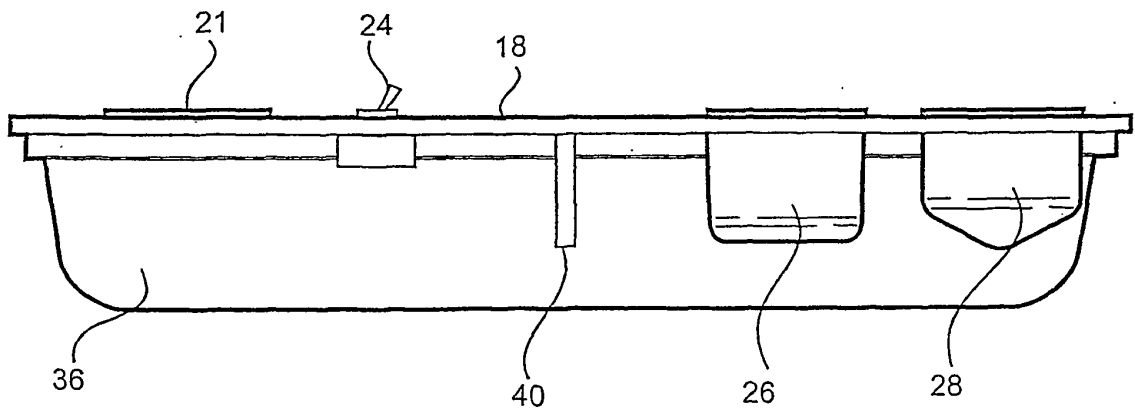


Fig. 3b.

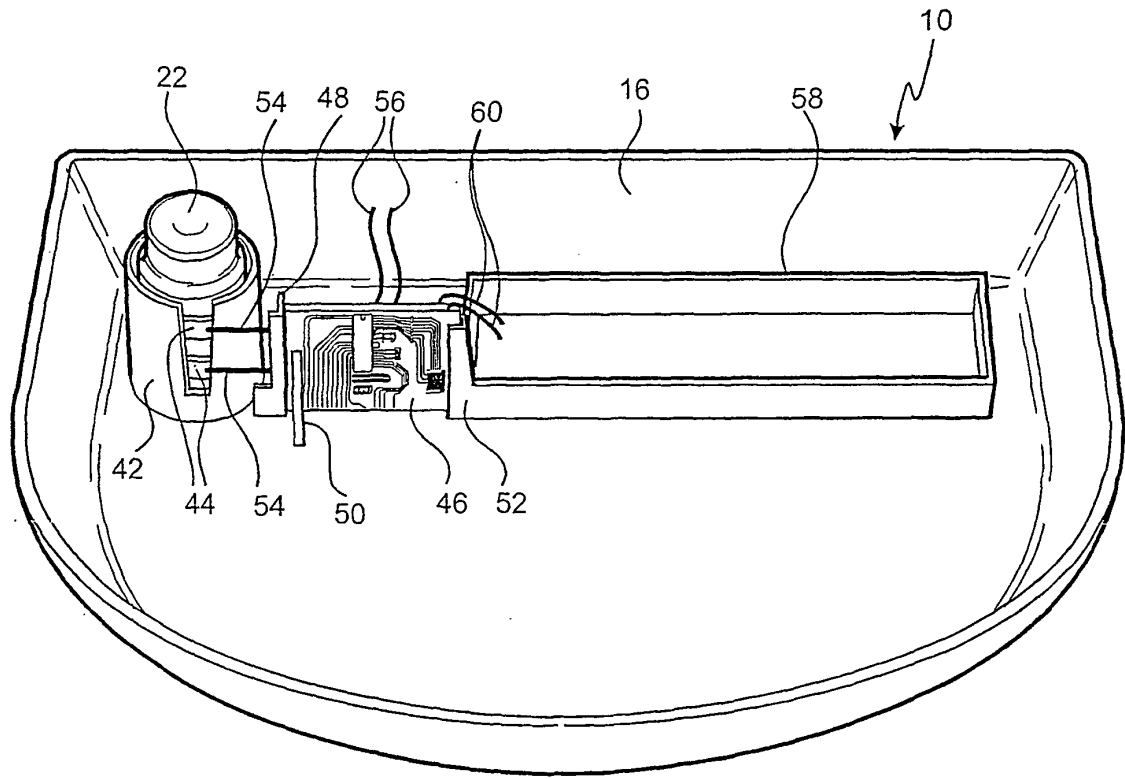


Fig. 4.