

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 962**

51 Int. Cl.:  
**A61K 35/12** (2006.01)  
**A61K 35/36** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03755791 .5**  
96 Fecha de presentación: **05.09.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1545565**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

54 Título: **Composiciones que comprenden fibroblastos y queratinocitos alogénicos inactivados mitóticamente para su utilización en la regeneración tisular**

30 Prioridad:  
**06.09.2002 US 408565 P**  
**19.12.2002 US 324257**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.04.2012**

73 Titular/es:  
**DFB PHARMACEUTICALS, INC.**  
**318 MCCULLOUGH STREET**  
**SAN ANTONIO, TEXAS 78215, US**

72 Inventor/es:  
**ROLLAND, Eric;**  
**HUNZIKER, Thomas;**  
**MIS, Beatrice y**  
**RINSCH, Christopher**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 377 962 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

Composiciones que comprenden fibroblastos y queratinocitos alogénicos inactivados mitóticamente para su utilización en la regeneración tisular

**Campo de la invención**

- 5 La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere en general a la regeneración tisular, por ejemplo, el tratamiento de heridas que usan células que secretan factor de crecimiento, citoquina, o factor angiogénico mezcladas con una matriz extracelular biológica o sintética aplicada a una herida.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Heridas (es decir, laceraciones o heridas abiertas) en tejido de mamíferos puede dar como resultado la rotura del tejido y la coagulación de la microvasculatura en la cara de la herida. La reparación de tal tejido representa una respuesta celular ordenada, controlada a la lesión. Todas las heridas de tejido blando, independientemente del tamaño, cicatrizan de manera similar. Los mecanismos de crecimiento de tejido y reparación son sistemas biológicos en los que se producen proliferación celular y angiogénesis en la presencia de un gradiente de oxígeno. Los cambios morfológicos y estructurales secuenciales, que se producen durante esta reparación de tejidos se han caracterizado en gran detalle y, en algunos casos, se han cuantificado. Véase Hunt, T- K, et al., "Coagulation and macrophage stimulation of angiogenesis and wound healing," en *The surgical wound*, p. 1 - 18, ed. F. Dineen & G. Hildrick-Smith (Lea & Febiger, Philadelphia: 1981).

- 15 La regeneración de tejido en diversos órganos, tales como, por ejemplo, la piel o el corazón depende del tejido conectivo que reestablece el suministro de sangre y permite que las células residuales específicas del órgano tales como queratinocitos o células musculares para restablecer la integridad del órgano. De este modo, una función relevante de las células mesenquimales, es decir, los fibroblastos o, además, las células endoteliales de vasculatura, es la secreción de factores que potencian el proceso de cicatrización, por ejemplo, factores que promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) o factores que promueven la re-epitelialización mediante proliferación y migración de queratinocitos.

- 20 La morfología celular de una herida consiste en tres zonas distintas. El espacio de herida sin vasos central es deficiente en oxígeno, acidótico e hipercárbico, y tienen altos niveles de lactato. Adyacente al espacio de la herida es una zona de gradiente de isquemia local, que se puebla por división de fibroblastos. Detrás de la zona principal está un área de síntesis de colágeno activo caracterizada por fibroblastos maduros y numerosos capilares recién formados (es decir, neovascularización). Aunque es necesario el crecimiento de nuevos vasos (angiogénesis) para la cicatrización de los tejidos heridos, los agentes angiogénicos en general son incapaces de cumplir la necesidad largamente sentida de proporcionar los efectos biosintéticos adicionales de reparación de tejidos. A pesar de la necesidad de una cicatrización más rápida de las heridas (es decir, quemaduras graves, incisiones quirúrgicas, laceraciones y otros traumas), hasta ahora solamente han tenido un éxito limitado en la aceleración de la cicatrización de heridas con agentes farmacológicas.

- 25 El principal objetivo en el tratamiento de heridas es lograr el cierre de la herida. Las heridas cutáneas abiertas representan una de las principales categorías de las heridas. Esta categoría incluye las quirúrgicas y traumáticas agudas, por ejemplo, úlceras crónicas, heridas de quemaduras, así como heridas crónicas tales como úlceras neuropáticas, llagas por presión, úlceras arteriales y venosas (estasis) o arteriovenosas mixtas, y úlceras diabéticas. Las heridas cutáneas abiertas de manera rutinaria cicatrizan mediante un proceso que comprende seis componentes principales: i) inflamación, ii) proliferación de fibroblastos, iii) proliferación de vasos sanguíneos, iv) síntesis de tejido conectivo, v) epitelialización, y vi) contracción de herida. La cicatrización de herida se altera estos componentes, o bien de manera individual o en conjunto, no funcionan adecuadamente. Numerosos factores pueden afectar a la cicatrización de heridas, incluyendo malnutrición, infección, agentes farmacológicos (por ejemplo, fármacos citotóxicos y corticosteroides), diabetes, y edad avanzada. Véase Hunt et al., en *Current Surgical Diagnosis & Treatment* (Way; Appleton & Lange), p. 86 - 98 (1988).

- 30 Las heridas cutáneas que no cicatrizan fácilmente pueden provocar aflicciones físicas, emocionales y sociales considerables al sujeto así como graves gastos financieros. Véase por ejemplo, Richey et al., *Annals of Plastic Surgery* 23(2): 159 - 65 (1989). De hecho, heridas que no cicatrizan de manera adecuada finalmente pueden requerir tratamiento quirúrgico más o menos agresivo, por ejemplo, injertos de piel autólogos. Se han desarrollado numerosas modalidades de tratamiento a medida que ha progresado el entendimiento básico de heridas y mecanismos de cicatrización de heridas por los científicos.

- 35 La modalidad convencional usada más comúnmente en la cicatrización de heridas de piel implica el uso de apósitos de heridas. En los años 1960, se produjo una importante ruptura en el cuidado de heridas cuando se descubrió que la cicatrización de heridas con apósitos oclusivos húmedos era, hablando en general, más eficaz que el uso de apósitos no oclusivos secos. Véase Winter, *Nature* 193: 293 - 94 (1962). Hoy, se usan de manera

rutinaria numerosos tipos de apósitos, incluyendo películas (por ejemplo, películas de poliuretano), hidrocoloides (partículas coloidales hidrófilas unidas a espuma de poliuretano), hidrogeles (polímeros reticulados que contienen aproximadamente al menos 60% de agua), espumas (hidrófilas o hidrófobas), alginatos de calcio (compuestos de fibras no tejidos de alginato de calcio), y celofán (celulosa con un plastificante). Véase Kennon et al., Dermatol. Surg. 21: 583 - 590 (1995); Davies, Burns 10: 94 (1983). Desafortunadamente, ciertos tipos de heridas (por ejemplo, úlceras diabéticas, llagas por presión) y las heridas de ciertos sujetos (por ejemplo, receptores de corticosteroides exógenos) no cicatrizan de una manera adecuada (o completamente) con el uso de tales apósitos.

También se han utilizado varias modalidades farmacéuticas en el intento de mejorar la cicatrización de heridas. Por ejemplo, regímenes de tratamiento que implican sulfato de cinc se han utilizado por algunos facultativos. Sin embargo, la eficacia de estos regímenes se ha atribuido principalmente a su inversión de los efectos de los niveles por debajo de lo normal de cinc en suero (por ejemplo, disminución de la resistencia del huésped y alteración de la actividad bactericida intracelular). Véase Riley, Am. Fam. Physician 24:107 (1981). Aunque otras deficiencias en vitaminas y minerales han estado asociadas a la disminución en la cicatrización de heridas (por ejemplo, deficiencias de vitaminas A, C y D; y calcio, magnesio, cobre, y hierro), no existe una fuerte evidencia sobre que el incremento de los niveles en suero de estas sustancias por encima de niveles normales realmente potencie la cicatrización de heridas. De este modo, excepto en circunstancias muy limitadas, la promoción de la cicatrización de heridas con estos agentes ha tenido poco éxito.

Lo que se necesita es un medio seguro, eficaz, e interactivo para potenciar la cicatrización de heridas extensiva y / o heridas difíciles de cicatrizar que se puedan usar sin tener en cuenta el tipo de herida o la naturaleza de la población de pacientes.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere al uso de factores angiogénicos u otros de crecimiento o citoquinas expresados por las células humanas en preparaciones no encapsuladas (en mezcla o en combinación con material matriz o sustancias biocompatibles sintéticas) para que se apliquen de manera temporal a heridas o defectos en tejidos cutáneos u otros para el restablecimiento de tejido conectivo suministrador de sangre para permitir que las células específicas de órgano restablezcan la integridad de órgano así como para inhibir la excesiva formación de cicatrices.

La invención contempla una composición de regeneración tisular que comprende:

(a) un primer componente que comprende fibrinógeno, en el que el primer componente está en la forma de una pulverización; y

(b) un segundo componente que comprende trombina y células alogénicas inactivadas mitóticamente, en el que el segundo componente está en la forma de una pulverización y en el que las células comprenden uno o más queratinocitos y fibroblastos que secretan una o más moléculas biológicamente activas seleccionadas entre el grupo de GM-CSF, VEGF, KGF, bFGF, TGF $\beta$ , angiopoyetina, EGF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF $\alpha$ , y TNF $\alpha$ .

La invención además proporciona un kit que comprende la composición de regeneración tisular que comprende:

(a) un primer componente que comprende fibrinógeno, en el que el primer componente está en la forma de una pulverización; y

(b) un segundo componente que comprende trombina y células alogénicas inactivadas mitóticamente, en el que el segundo componente está en la forma de una pulverización y en el que las células comprenden uno o más queratinocitos y fibroblastos que secretan una o más moléculas biológicamente activas seleccionadas entre el grupo que consiste en GM-CSF, VEGF, KGF, bFGF, TGF $\beta$ , angiopoyetina, EGF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TGF $\alpha$ , y TNF $\alpha$ .

Se describe una preparación de células útil para la regeneración tisular, por ejemplo, para uso en el tratamiento de heridas cutáneas, que contienen uno o más tipos de células que secretan una o más sustancias biológicamente activas, mezcladas con o aplicadas a una matriz extracelular o material de matriz de manera que la mezcla forma una preparación de células viscosa o polimerizada. Como se usa en el presente documento, el término "mezclado" abarca cualesquiera procedimientos de combinación, mezcla, fusión, unión etc. conocidos por los expertos en la técnica. Los tipos de células usados en la preparación de células de la invención son fibroblastos y queratinocitos mitóticamente inactivados,

El principal tipo de células de tejido conectivo es el fibroblasto. Hasta hace poco, fibroblastos se han tratado como poblaciones de células homogéneas no diferenciadas. Sin embargo, el sistema de células de fibroblastos en diversas especies, incluyendo el hombre, es un sistema de células del tronco en el que los fibroblastos se diferencian por último a lo largo de siete fases, tres incluyendo células mitóticas y cuatro incluyendo células post mitóticas. Véase Bayreuther et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5112 - 16 (1988); Bayreuther et al., J. Cell. Sci.

- Suppl. 10: 115 - 30 (1988). La inducción *in vitro* de diferenciación de fibroblastos se puede realizar mediante agentes químicos o biológicos, tal como mitomicina C (Bienneisen et al., Exp. Cell. Res. 211: 219 - 30 (1994)) o factores de crecimiento o citoquinas (Hakenjos et al., Int. J. Radiat. Biol. 76: 503 - 09 (2000)) tal como TGF beta 1, IL-1, IL-6, Interferón alfa. La inducción *in vitro* también se puede realizar por irradiación, por ejemplo, con rayos  $\gamma$ ; rayos X (Bumann et al., Strahlenther. Onkol. 171: 35 - 41 (1995); luz UV (Rodemann et al., Exp. Cell. Res. 180: 84 - 93 (1989); o exposición física a campos electromagnéticos (Thumm et al., Radiat. Environ. Biophys. 38: 195 - 99 (1999). Además, inducción de diferenciación también se puede realizar por condiciones de cultivo tal como falta de suero, inhibición de contacto, o la adición de mitomicina C. Véase Palka et al., Folia Histochem. Cytobiol. 34: 121 - 27 (1996).
- 10 Hasta la fecha, las propiedades de función/biológicas de los fibroblastos diferenciados se han estudiado escasamente. Sin embargo, el patrón de expresión y secreción de polipéptido varía entre fases mitóticas y post mitóticas. Los polipéptidos respectivos se están todavía analizando. Véase, por ejemplo, Francz, Eur. J. Cell. Biol. 60: 337 - 45 (1993).
- 15 La molécula biológicamente activa es al menos un factor angiogénico, al menos un factor de crecimiento/citoquina, o una combinación de al menos un factor angiogénico y al menos un factor de crecimiento/citoquina. Ejemplos de moléculas biológicamente activas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, familia de factor de crecimiento epidérmico-factor de crecimiento (EGF); factor de crecimiento de transformación alfa (TGF alfa); factor de crecimiento de hepatocitos (HGF/SF); Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (EGF); factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF); otros factores de crecimiento de fibroblastos (FGF); factor de crecimiento de queratinocitos (KGF); factores de crecimiento de transformación (TGF)  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2; factor de crecimiento de transformación (TGF)  $\beta$ 3; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF); factor de necrosis tumoral (TNF); interleuquina-1 (IL-1) e interleuquina-6 (IL-6); otros miembros de la familia interleuquina/citoquina; factor de crecimiento 1 de tipo insulina (IGF-1); factor 1 estimulador de colonias (CSF-1); y factor estimulador de de la colonia de macrófagos de granulocitos (GM-CSF).
- 20
- 25 En realizaciones preferidas, la matriz extracelular o material de matriz se seleccionada entre el grupo que consiste en fibrina, cola de fibrina, fibrinógeno, perlas de fibrina.
- En una realización adicional, los tipos de células están mitóticamente inactivados, por ejemplo, inducidos a diversas fases de diferenciación. Por ejemplo, esta inactivación mitótica se puede realizar por la administración de mitomicina C u otros inhibidores mitóticos basados químicamente, irradiación con Rayos- $\gamma$ , irradiación con Rayos-X, y / o irradiación con luz UV.
- 30 En otra realización, los tipos de células se inmortalizan usando al menos un gen/polipéptido seleccionados entre el grupo que consiste en los productos 12S y 13S de los genes E1A de adenovirus, hTERT, antígeno T pequeño de SV40, antígeno T grande de SV40, virus de papiloma E6 y E7, el virus Epstein-Barr (EBV), antígeno-2 nuclear Epstein-Barr (EBNA2), virus 1 de leucemia de células T humano (HTLV-1), tax HTLV-1, Herpesvirus saimiri (HVS), p53 mutante, *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *c-Ha-ras*, *h-ras*, *v-src*, *c-fgr*, *myb*, *c-myc*, *n-myc*, y *Mdm2*.
- 35 En incluso realizaciones adicionales, los tipos de células se modifican por ingeniería genética para secretar una o más moléculas biológicamente activas, tal como al menos un factor angiogénico, al menos un factor de crecimiento/citoquina, o una combinación de al menos un factor angiogénico y al menos un factor de crecimiento/citoquina. Esta secreción puede ser constitutiva, o puede estar controlada por cambio de genes.
- 40 La invención además proporciona la composición de regeneración tisular, como se define en las reivindicaciones para uso en la regeneración tisular, en la que la composición de regeneración tisular se va a administrar por vía tópica a un sitio de herida en un paciente en necesidad de tratamiento.
- 45 En diversas otras realizaciones, la invención también proporciona la composición de regeneración tisular como se indica en las reivindicaciones para uso en el tratamiento o heridas mediante administración a las células de preparaciones de acuerdo con la invención a un sitio de herida en un paciente en necesidad de tratamiento de heridas. La preparación de células de la invención se puede administrar por vía local a un sitio de herida en un paciente para inducir temporalmente la regeneración tisular por interacción biológica con los tejidos circundantes. La preparación de células de la invención se va a administrar por pulverización de los componentes en un sitio de herida en un paciente para inducir temporalmente la regeneración tisular por interacción biológica con los tejidos circundantes. La preparación de células pulverizada puede dar como resultado la formación de una matriz en el sitio de herida.
- 50 En diversas realizaciones, estos tipos de células se diferencian en fibroblastos y queratinocitos, y la molécula biológicamente activa es al menos un factor angiogénico, al menos un factor de crecimiento/citoquina, o una combinación de al menos un factor angiogénico y al menos un factor de crecimiento/citoquina. En otras
- 55

realizaciones, los tipos de células pueden estar mitóticamente inactivados por administración de mitomicina C u otros inhibidores mitóticos a base de química, irradiación con Rayos-γ, irradiación con Rayos-X, o irradiación con luz UV.

5 En otras realizaciones, los tipos de células se immortalizan usando al menos un gene/polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en los productos 12S y 13S de los genes adenovirus E1A, hTERT, antígeno T pequeño de SV40, antígeno T grande de SV40, virus de papiloma E6 y E7, el virus Epstein-Barr (EBV), antígeno-2 nuclear Epstein-Barr (EBNA2), virus 1 de leucemia de células T humano (HTLV-1), tax HTLV-1, Herpesvirus saimiri (HVS), p53 mutante, *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *c-Ha-ras*, *h-ras*, *v-src*, *c-fgr*, *myb*, *c-myc*, *n-myc*, y *Mdm2*.

10 En otro aspecto, esta invención proporciona un kit que comprende una preparación de células para la regeneración tisular como se define en las reivindicaciones 1 - 7.

15 La inactivación mitótica de las células se puede realizar por administración de mitomicina C u otros inhibidores mitóticos a base de química, irradiación con Rayos-γ, irradiación con Rayos-X, o irradiación con luz UV. En diversos aspectos, los tipos de células se immortalizan usando al menos uno de los siguientes: los productos 12S y 13S de los genes de adenovirus E1A, hTERT, antígeno T pequeño de SV40, antígeno T grande de SV40, virus de papiloma E6 y E7, el virus Epstein-Barr (EBV), antígeno-2 nuclear Epstein-Barr (EBNA2), virus 1 de leucemia de células T humano (HTLV-1), tax HTLV-1, Herpesvirus saimiri (HVS), p53 mutante, *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *c-Ha-ras*, *h-ras*, *v-src*, *c-fgr*, *myb*, *c-myc*, *n-myc*, y *Mdm2*.

20 Los tipos de células pueden secretar de manera natural la una o más moléculas biológicamente activas o se pueden modificar por ingeniería genética para secretar un nivel exógeno de la una o más moléculas biológicamente activas. La secreción se puede controlar por cambio de genes o puede ser constitutiva. En una realización, el primer componente contiene fibrinógeno. En otra realización, el primer componente contiene fibrinógeno y el segundo componente contiene entre aproximadamente  $1 \times 10^3$  células/μl y aproximadamente  $50 \times 10^3$  células/μl. El segundo componente también contiene trombina y puede opcionalmente contener un crioprotector tal como una solución al 10% de glicerol, una solución al 15% de glicerol, y una solución al 15% de glicerol y albúmina sérica humana al 5%.

25 En todavía otro aspecto, la invención proporciona la composición de regeneración tisular como se define en las reivindicaciones para uso en regeneración tisular en un sitio de herida en un paciente en necesidad de tratamiento. Este uso implica la las etapas de proporcionar un primer componente que contiene una matriz extracelular o material de matriz que contiene fibrinógeno; proporcionar un segundo componente que contiene entre aproximadamente  $1 \times 10^3$  células/μl y aproximadamente  $50 \times 10^3$  células/μl y trombina, en la que las células que secretan una o más moléculas biológicamente activas son alogénicas, inactivadas, y son queratinocitos y fibroblastos que combinan el primer y segundo componentes para formar una preparación de células adecuadas para la regeneración tisular; y administración de la preparación de células al sitio de herida.

30 En una realización, el primero y segundo componentes se aplican por vía tópica al sitio de la herida. El primer componente se puede aplicar al sitio de la herida antes o después del que se aplique el segundo componente. En otra realización, el primero y segundo componentes se pulverizan en el sitio de herida. Preferiblemente, el primer componente se pulveriza en el sitio de herida antes de que se pulverice el segundo componente en el sitio de herida. El primero y segundo componentes se pueden combinar en el sitio de herida o se pueden combinar antes de alcanzar el sitio de la herida.

35 En una realización, el segundo componente puede opcionalmente contener un crioprotector que incluye, pero no se limita a, una solución al 10% de glicerol, una solución al 15% de glicerol, y una solución al 15% de glicerol y albúmina sérica humana al 5%..

40 En otro aspecto, la invención implica una preparación de células para la regeneración tisular que contienen una matriz extracelular o material de matriz que contiene fibrinógeno mezclado con un segundo componente que contiene entre aproximadamente  $1 \times 10^3$  células/μl y aproximadamente  $50 \times 10^3$  células/μl y trombina, en la que las células secretan una o más moléculas biológicamente activas (tal como al menos un factor angiogénico, al menos un factor de crecimiento/citoquina, o las combinaciones de los mismos) son alogénicos, mitóticamente inactivados, y seleccionadas entre el grupo que consiste en células del estroma, epitelio/órgano específico, y derivadas de sangre células.

45 Estos tipos de células pueden ser fibroblastos y queratinocitos diferenciados. La preparación de células resultante puede estar en la forma de una pasta. En diversas realizaciones, la matriz extracelular o material de matriz puede ser fibrina, cola de fibrina, fibrinógeno, perlas de fibrina.

50 La inactivación mitótica de las células se puede realizar por administración de mitomicina C u otros inhibidores mitóticos basados en química, irradiación con Rayos-γ, irradiación con Rayos-X, o irradiación con luz UV. En diversas realizaciones, los tipos de células se immortalizan usando al menos uno de los siguientes: los productos 12S y 13S de los genes de adenovirus E1A, hTERT, antígeno T pequeño de SV40, antígeno T grande de SV40,

virus de papiloma E6 y E7, el virus Epstein-Barr (EBV), antígeno-2 nuclear Epstein-Barr (EBNA2), virus 1 de leucemia de células T humano (HTLV-1), tax HTLV-1, Herpesvirus saimiri (HVS), p53 mutante, *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *c-Ha-ras*, *h-ras*, *v-src*, *c-fgr*, *myb*, *c-myc*, *n-myc*, y *Mdm2*.

5 Los tipos de células pueden naturalmente secretar la una o más moléculas biológicamente activas o se pueden modificar por ingeniería genética para secretar un nivel exógeno de la una o más moléculas biológicamente activas. La secreción se puede controlar por cambio de genes o puede ser constitutiva. En una realización, el segundo componente puede opcionalmente contener un crioprotector que incluye, pero no se limita a una solución al 10% de glicerol, una solución al 15% de glicerol, y una solución al 15% de glicerol y albúmina sérica humana al 5%.

10 La invención también proporciona el uso de tal preparación de células proporcionando el primero y segundo componentes, combinación del primero y segundo componentes y administración de la preparación de células resultante al sitio de la herida. En diversas realizaciones, los componentes se pueden administrar por vía tópica al sitio de la herida en un paciente o se pueden pulverizar en el sitio de la herida. Cuando se administra la pulverización, el primero y segundo componentes se pueden combinar en el sitio de herida o se pueden combinar antes de alcanzar el sitio de la herida.

15 En otro aspecto, el primero y segundo componentes de los kits de la invención se crioconserva antes del transporte y posteriormente se descongelan antes de su uso. Cada componente puede estar contenido en un vial separado con un tapón roscada separable, en el que el vial es estéril y está hecho de material resistente a las bajas temperaturas y en el que la tapa separable se puede reemplazar con una bomba de pulverización después de descongelar el primero y segundo componentes antes de uso. En una realización, la bomba de pulverización  
20 administra un volumen de aproximadamente 130 µl por pulverización, Los materiales adecuados resistentes a las bajas temperaturas incluyen, pero no se limitan a, vidrio, polipropileno, polietileno, y etilen vinil acetato (EVA). en algunas realizaciones, cada vial puede tener un espesor de pared de aproximadamente 0,8 mm y puede mantener un volumen de trabajo de aproximadamente 2 ml del primero y segundo componentes. En otra realización, los viales se sellan dentro de una bolsa o recipiente antes de la crioconservación, en el que la bolsa o recipiente se fabrica de un material capaz de soportar temperaturas que varían entre -80°C y -160°C y en el que la bolsa o reci piente  
25 protege el primero y segundo componentes de la contaminación durante la crioconservación, almacenamiento, y posterior descongelación. La bolsa es preferiblemente a prueba de agua y tiene un alto comportamiento de barrera.

30 Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido por los expertos en la técnica al que esta invención pertenece. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o ensayo de la presente invención, los procedimientos y materiales adecuados se describen más adelante.

35 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

**Breve descripción de las Figuras**

FIG. 1 es un histograma que muestra los resultados de un análisis de proliferación celular BrdU de fibroblastos primarios humanos después de 15 y 30 días en cultivo después de radiación gamma.

40 FIG. 2 es un histograma que muestra la adherencia de fibroblastos primarios humanos a una placa petri después de tratamientos de radiación gamma.

FIG.3 es una tabla que muestra los resultados de ensayo para diluciones óptimas de trombina y fibrinógeno para la formulación de una pulverización matriz de cola de fibrina aplicada por pulverización.

45 FIG. 4 es un histograma que compara la cantidad de factores secretados por las matrices celulares cuando se pulverizan diferentes dosis de células en pocillos individuales de una placa de cultivo de 24 pocillos. La figura también muestra las cantidades de secreción del factor de crecimiento cuando la matriz de fibrina que contiene células se prepara mediante un pipeteado sencillo (administración no pulverizada) del fibrinógeno y la trombina + suspensiones de células conjuntamente.

50 FIGS. 5a y 5b son histogramas que demuestran que la mezcla de queratinocitos y fibroblastos pulverizados a diferentes relaciones, mientras se mantiene un número total constante de células, da lugar a características de secreción de factor de crecimiento variable.

FIGS. 6a y 6b son imágenes de un vial novedoso usado para la distribución y administración de la preparación de células de la invención.

FIG. 6a es una sección transversal del vial. FIG. 6b es un dibujo en tres dimensiones del exterior del vial, que está diseñado para mantener un volumen de trabajo de 2 ml del componente.

FIG. 7 es un histograma que compara la secreción del factor de crecimiento por las células almacenadas durante una semana a -160°C frente a las células almacenadas a -80°C cuando se usa una solución de glicerol al 10% como crioprotector.

FIG. 8 es un histograma que compara la secreción del factor de crecimiento por células almacenadas durante una semana a -80°C en glicerol al 10% contra glicerol al 15%.

FIG. 9 es un histograma que compara la secreción del factor de crecimiento by células almacenadas durante una semana a -80°C en glicerol al 15% contra glicerol al 15% + HSA al 5%.

FIG. 10 es un histograma que muestra la secreción de factores de crecimiento GM-CSF y VEGF por preparaciones de células fabricadas en diferentes producciones después de o bien una, cuatro, ocho, o doce semanas de almacenamiento a -80°C. en este experimento, la preparación de componentes de células se congelaron usando glicerol al 15% + albúmina sérica humana al 5% como crioprotector.

FIG. 11 es un histograma que muestra la secreción del factor de crecimiento por preparaciones de células congeladas almacenadas congeladas durante una semana a -80°C. Se muestran los resultados de diversas relaciones de queratinocito:fibroblasto y el número de células.

### **Descripción detallada de la invención**

Cicatrización de heridas es un proceso complejo que implica mediadores solubles, células sanguíneas, matriz extracelular, y células parenquimales. La cicatrización de heridas tiene tres fases - la fase de inflamación, la fase de información de tejidos, y la fase de remodelación de tejidos. Estas fases se pueden superponer en tiempo.

En general, una lesión al tejido rompe los vasos sanguíneos y conduce a la extravasación de constituyentes sanguíneos. La coagulación de la sangre ayuda a reestablecer la hemostasis y proporciona una matriz extracelular provisional para la migración celular a la herida. En el sitio de la herida, las plaquetas (trombocitos) facilitan la formación de un tapón hemostático y también secretan varios mediadores del proceso de cicatrización de heridas. Estos mediadores incluyen, por ejemplo, moléculas tal como factor de crecimiento derivado de plaquetas que atrae y activa los monocitos y fibroblastos.

Inmediatamente después de la lesión, los neutrófilos se infiltran en la herida y limpian la herida de partículas extrañas y bacterias. Los neutrófilos después se extruden con una escara o se someten a fagocitosis por macrófagos. Monocitos también se infiltran en la herida en respuesta a quimioattractivos específicos, tales como fragmentos de proteínas de matriz extracelular, factores  $\beta$  de crecimiento de transformación, la proteína 1 quimioattractiva de monocitos, y posteriormente llegan a ser macrófagos activados. Estos macrófagos activados liberan factores de crecimiento tal como factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento endotelial vascular, que inicia la formación de tejido de granulación. Los macrófagos se unen mediante sus receptores de integrina a proteínas en la matriz extracelular. Esta unión estimula la fagocitosis de macrófago de cualesquiera microorganismos así como fragmentos de matriz extracelular.

Monocitos, estimulados por la adherencia a la matriz extracelular, también experimentan metamorfosis en los macrófagos inflamatorios. Esta adherencia a la matriz extracelular induce monocitos y macrófagos para expresar el factor 1 estimulador de colonias, factor  $\beta$  de necrosis tumoral, y factor de crecimiento derivado de plaquetas. Otras citoquinas importantes expresadas por monocitos y los macrófagos son factor  $\alpha$  de crecimiento de transformación, interleuquina-1, factores de crecimiento  $\beta$  1 - 3 de transformación, y factor de crecimiento 1 de tipo insulina. Los factores de crecimiento derivados de monocitos- y macrófagos se creen necesarios para el inicio y propagación de formación de nuevos tejidos en heridas.

Dentro de unas horas después de la lesión, comienza la reepitelialización de heridas. Queratinocitos de los bordes de la herida así como los apéndices de piel residual tal como folículos pilosos se someten a cambios marcados en el fenotipo, incluyendo retracción de tonofilamentos intracelulares, disolución de la mayoría de desmosomas intercelulares, y formación de filamentos de actina citoplásmicos periféricos. Además, las uniones hemidesmosomales entre los queratinocitos y la membrana basal epidérmica se disuelve, permitiendo el movimiento de queratinocitos.

En unos pocos días después de la lesión, los queratinocitos en el margen de la herida comienzan a proliferar después de las células que migran. Cuando esta reepitelización se produce, las proteínas de membranas basales reaparecen en una secuencia ordenada desde el margen del exterior de la herida. Queratinocitos que revierten su fenotipo normal y se unen ellos mismos a la membrana basal reestablecida y dermis subyacente.

Dentro de aproximadamente cuatro días después de la lesión, nuevo estroma comienza a infiltrarse en la herida. De manera simultánea, los macrófagos, fibroblastos, y vasos sanguíneos también se infiltran en la herida. Los macrófagos proporcionan una fuente de factores de crecimiento que estimulan fibroplasia y angiogénesis. Los fibroblastos producen la nueva matriz extracelular que soporta la célula en crecimiento. Los nuevos vasos sanguíneos llevan oxígeno y nutrientes que sostienen las células.

Factores de crecimiento, particularmente factor de crecimiento derivado de plaquetas y factor de crecimiento de transformación  $\beta 1$ , se cree que estimulan los fibroblastos del tejido alrededor de la herida para que proliferen. De hecho, factor de crecimiento derivado de plaquetas se ha mostrado que acelera la cicatrización de llagas crónicas por presión y úlceras diabéticas. El factor de crecimiento de fibroblastos básico también se ha usado con algún éxito para tratar llagas por presión crónicas.

Sin embargo, existen muchos factores que pueden conducir a la cicatrización anormal de heridas. Un ejemplo se produce también con úlceras diabéticas. Típicamente, las úlceras diabéticas muestran patologías bioquímicas múltiples que pueden conducir a la cicatrización alterada. Estas úlceras se producen en pacientes que no pueden sentir y aliviar la presión continua debida a algún tipo de neuropatía diabética. Frecuentemente, las úlceras diabéticas se llegan a infectar debida a la alteración de la función de granulocitos y quimiotaxis. Pacientes con úlceras diabéticas también experimentan inflamación, neovascularización alterada, síntesis disminuida de colágeno, niveles aumentados de proteinasas, y función defectuosa de macrófago.

En conjunto la experiencia clínica que usa factores de crecimiento aislados, por ejemplo, recombinantes, y otros mediadores para acelerar la cicatrización de heridas no se ha conseguido con gran éxito, quizás debido a la reparación de la herida es el resultado de un conjunto complejo de interacciones entre factores solubles, elementos sanguíneos formados, matriz extracelular, y células. La combinación de diversos factores de crecimiento a intervalos cuidadosamente controlados puede promover cicatrización de heridas más eficaz.

La presente invención se describe en las reivindicaciones 1 - 25.

En una realización, las células pueden distribuir factores angiogénicos endógenos u otros factores de crecimiento. En otra realización, las células se pueden modificar por ingeniería genética para producir cantidades exógenas del factor deseado. Preferiblemente, las células son alogénicas.

En particular, fibroblastos y queratinocitos se ha mostrado que juegan un papel importante en la cicatrización de heridas cutáneas. Estos papeles incluyen la estimulación de migración y proliferación celular, estimulación de la producción de la matriz extracelular, producción de factores de crecimiento y citoquinas, estimulación de angiogénesis, y liberación de proteasas que disuelve el tejido no viable y su barrera de fibrina.

Cicatrización de heridas se puede promover por el uso de factores de crecimiento y / o angiogénicos. Por ejemplo, una preparación de cicatrización de heridas adecuada consiste en dos componentes crioconservados, es decir, fibrinógeno y fibroblastos y queratinocitos humanos alogénicos detenidos de crecimiento suspendidos en trombina. Después de descongelar, estos componentes se pulverizan secuencialmente en el lecho de la herida para formar una matriz de fibrina delgada que contiene dos tipos de células vivas pero no proliferantes derivadas de piel, que, durante varios días, producen de manera interactiva factores de crecimiento y angiogénicos relevantes para la cicatrización de heridas (por ejemplo, VEGF, GM-CSF, bFGF, KGF).

Las células pueden ser o bien inmortalizadas o cultivos de células primarias. Las células se pueden inmortalizar mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Un planteamiento común para alargar la durabilidad de una célula es transferir un virus o un plásmido que contiene uno o más genes de inmortalización. La inmortalización de células aumenta la durabilidad de una célula, y la línea celular resultante es capaz de subcultivarse muchas más veces que las células originales. Los genes de inmortalización se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Katakura et al., *Methods Cell Biol.* 57: 69-91 (1998). Las proteínas y polipéptidos de inmortalización incluyen, pero no se limitan a, los productos 12S y 13S de los genes de adenovirus E1A, antígenos T pequeños y grandes de SV40, virus de papiloma E6 y E7, el virus Epstein-Barr (EBV), antígeno-2 nuclear Epstein-Barr (EBNA2), virus 1 de leucemia de células T humano (HTLV-1), tax HTLV-1, Herpesvirus saimiri (HVS), p53 mutante, y las proteínas de los oncogenes tales como *myc*, *c-jun*, *c-ras*, *c-Ha-ras*, *h-ras*, *v-src*, *c-fgr*, *myb*, *c-myc*, *n-myc*, y *Mdm2*. De manera adicional, células se pueden inmortalizar espontáneamente. Una estrategia de inmortalización preferida es por transferencia del gen que codifica la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) en la célula de manera que TERT estaba o bien expresada de manera estable o transitoria dando como resultado la expresión de la actividad de la telomerasa. La actividad de la telomerasa, cuando se expresa en células somáticas normales, puede conducir al alargamiento de puntas de cromosoma o caperuzas protectoras, llamadas telómeros, dando como resultado por lo tanto la capacidad de las células que expresan telomerasa para llegar a inmortalizarse sin llegar a transformarse (Véase Jiang, et al., *Nature Genetics* 21: 111 - 14 (1999) y Morales, et al., *Nature Genetics* 21: 115 - 18 (1999)). Los telómeros son estructuras especializadas en los extremos de cromosomas eucarióticos y que parecen funcionar en la estabilización, posicionamiento, y replicación de

5 cromosomas. Véase Blackburn & Szostak, 53 Ann. Rev. Biochem. 163 - 194 (1984); Zakian, 23 Ann. Rev. Genetics 579 - 604 (1989); Blackburn, 350 Nature 569 - 573 (1991). En todos los vertebrados, los telómeros constan de cientos a miles de repeticiones en tándem de la secuencia 5'-TTAGGG-3' y proteínas asociadas. Véase Blackburn, 350 Nature 569 - 573 (1991); Moyzis et al., 85 Proc. Natl. Acad. Sci. 6622 - 6626 (1988). El análisis de transferencia de Southern de fragmentos de restricción terminal de cromosomas (TRF) proporciona las longitudes del compuesto de todos los telómeros en una población celular. Véase Harley et al., 3445 Nature 458 - 460 (1990); Allsopp et al., 89 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10114 - 10118 (1992); Vaziri et al., 52 Am. J. Human Genetics 661 - 667 (1993). En todas las células somáticas normales examinadas hasta la fecha, el análisis TRF ha mostrado que los cromosomas pierden aproximadamente 50 - 200 nucleótidos de secuencias teloméricas por división celular, consistente con la incapacidad de la ADN polimerasa para replicar ADN lineal a los extremos. Véase Watson, 239 Nature New Biology 197 - 201 (1972).

15 Este acortamiento de telómeros se ha propuesto que sea un cierre mitótico mediante el cual las células cuentan sus divisiones (véase Harley, 256 Mut. Res. 271 - 282 (1991)), y telómeros suficientemente cortos puede ser la señal para la senescencia replicativa en células normales. Véase Hastie et al., 346 Nature 866 - 868 (1990); Lindsey et al., 256 Mut. Res. 45 - 48 (1991); Wright & Shay, 8 Trends Genetics 193 - 197 (1992). Por el contrario, la gran mayoría de células inmortales examinadas hasta la fecha no muestran ninguna pérdida de longitud o secuencia de telómero con las divisiones celulares, que sugiere que se requiere el mantenimiento de telómeros para que las células se escapen de la senescencia replicativa y proliferan indefinidamente. Véase Counter et al., 11 EMBO 1921 - 1929 (1992); Counter et al., 91 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2900 - 2940, 1994).

20 La telomerasa, una única ribonucleoproteína ADN polimerasa, es la única enzima conocida que sintetiza ADN telomérico en los extremos cromosómicos usando como molde una secuencia contenida dentro del componente de ARN de la enzima. Véase Greider & Blackburn, 43 Cell 405 - 413 (1985); Greider & Blackburn, 337 Nature 331 - 337 (1989); Yu et al., 344 Nature 126 - 132 (1990); Blackburn, 61 Ann. Rev. Biochem. 113 - 129 (1992). Con relación a las células y tejidos humanos, la actividad de la telomerasa se ha identificado en líneas de células inmortales en un carcinoma de ovario pero no se ha detectado en cepas de células mortales o en tejidos de línea no germinales normales. Véase Morin, 59 Cell 521 - 529, 1989. Conjuntamente con el análisis de TRF, estos resultados sugieren que la actividad de telomerasa está directamente implicada en el mantenimiento a telómero, que liga esta enzima a la inmortalidad celular.

30 La expresión del componente catalítico de telomerasa humano (hTERT) se ha estudiado recientemente en células somáticas humanas. Véase Jiang, et al., 21 Nature Genetics 111 - 114 (1999). La expresión de la telomerasa en células somáticas normales no parecían inducir cambios asociados a un fenotipo maligno tal como control de crecimiento anormal o transformación oncogénica. La ausencia de cambios asociados a cáncer también se reseñó en fibroblastos humanos inmortalizados con telomerasa. Véase Morales, et al., 21 Nature Genetics 115 - 118 (1999). Se ha demostrado que la introducción de la telomerasa en células somáticas humanas normales no conducen a la transformación de crecimiento, no derivan los controles de de punto de control inducidos por ciclo celular y no conducen a la inestabilidad genómica de estas células. Se han descrito los procedimientos para detectar la actividad de telomerasa, así como para identificar los compuestos o polipéptidos que regulan o afectan a la actividad de la telomerasa, conjuntamente con los procedimientos para terapia o diagnóstico de senescencia e inmortalización celular por control o medida de la longitud de telómero y actividad de la telomerasa, (véase solicitud de patente internacional PCT WO 93/23572). La identificación de compuestos que afectan a la actividad de la telomerasa proporciona importantes beneficios a los esfuerzos en el tratamiento de enfermedad humana.

45 Las células de acuerdo con la invención también se pueden modificar por ingeniería genética para producir una o más moléculas biológicamente activas de manera que las moléculas se secretan de manera constitutiva a partir de células. Por "secretado de manera constitutiva" significa que la molécula biológicamente activa deseada se expresa de manera continua. De manera alternativa, las células se pueden modificar por ingeniería genética de manera que su expresión está controlada por el cambio de genes.

50 Como se usa en el presente documento, los términos "cambio de gen" y "cambio génico" se refieren a procedimientos de regulación de expresión génica. De manera específica, expresión de una proteína codificada por un gen se controla por la interacción de ciertas proteínas reguladoras, conocidas como proteínas de unión a ADN, con una región localizada cadena arriba del gen. Dentro de la región promotora, se localizan varias regiones de operador que contiene una secuencia de oligonucleótidos específica a los que estas v de unión a ADN se unen específicamente. Estas proteínas pueden conducir o bien a la activación o represión de la expresión génica. De este modo, controlan la expresión regulada de los genes.

55 La proteína reguladora está codificada por un gen regulador localizado en cualquier parte del cromosoma. La interacción de regulador y operador está afectada por la presencia o ausencia de factores químicos particulares (inductores). De este modo, en circunstancias normales se expresa el regulador, uniendo por lo tanto el operador e inhibiendo la expresión del gen, hasta que se indique una necesidad de la proteína particular codificada por el gen por la aparición en el ambiente de un inductor específico que interactúa con el regulador para inhibir la unión al

operador, permitiendo de este modo la expresión del gen.

Por ejemplo, una enzima, que actúa después que una molécula de azúcar no se requiera salvo que el azúcar esté presente y, por lo tanto, en ausencia del azúcar, el gen regulador expresa la proteína reguladora, que se une al gen operador e inhibe la expresión de la enzima. El propio azúcar actúa como inductor, que después interactúa como regulador para evitar su unión al operador permitiendo de este modo la expresión de la enzima. La digestión del azúcar por la enzima se elimina del ambiente permitiendo que el regulador para regresar a su modo normal y actúan de manera normal para inactivar la expresión de enzima.

Tal mecanismo regulador se puede ver como disposición de cambio que conecta la expresión génica y la desconecta según disponga el contenido químico del ambiente. Los sistemas de cambio de genes del tipo descrito se conocen mejor en bacterias y muchas de las proteínas y sus sitios de unión a ADN diana se conocen en gran detalle. Las proteínas reguladoras usualmente se unen en forma de dímeros a operadores, que muestran una simetría de dos pliegues. La especificidad de la interacción regulador/promotor se determina por la interacción específica de secuencia de aminoácidos específicos del regulador con el ADN operador. En algunos sistemas las interacciones se han sometido a análisis bioquímico detallado así como cristalografía de alta resolución por rayos X. La clase mejor caracterizada de proteínas de unión a ADN muestran un motivo común hélice-giro-hélice con algún grado homología de secuencia de aminoácido. Está claro que el dominio de unión a ADN crítico del regulador está contenido dentro de la región hélice-giro-hélice.

En eucariotas, se ha mostrado que el control de la expresión génica también está regulado por la interacción de factores de proteína específicos que se unen a secuencias de ADN cerca de la región promotora de genes. Se han aislado numerosos factores de células de levaduras y de mamíferos y se ha mostrado que interactúan con motivos de secuencia específicos de una manera específica de secuencia similar a la observada en sistemas bacterianos. La caracterización de algunos de estos factores han revelado un nuevo motivo "dedo", que puede estar implicado en la unión de proteínas específica de secuencia.

Además, se ha demostrado que la expresión génica eucariótica se puede controlar por el uso de moléculas represoras bacterianas en células eucarióticas. En estos experimentos las secuencias operadoras bacterianas se han insertado cerca de los promotores de genes de mamífero. Se han creado líneas celulares que expresan el represor bacteriano. El control de expresión de los genes eucarióticos diana con inserciones de operador por moléculas represoras han demostrado que usan ensayos de expresión transitoria, en estos experimentos no solamente se ha demostrado la expresión génica por el represor lac sino también la inducción de expresión génica, esto es, mitigación de la represión, usando IPTG (isopropil tiogalactósido).

Por lo tanto, el conocimiento y manipulación detallada de interacciones ADN proteína se puede usar para controlar la expresión en cultivos de células de mamíferos. Las técnicas de cambio de genes se describen, por ejemplo en la patente de Estados Unidos N° 6.010.887. Los expertos en esta técnica reconocerán que también se pueden emplear en los procedimientos de regulación de cambio de genes en los procedimientos y composiciones de la invención. Las células se pueden modificar por ingeniería genética para secretar una o más moléculas biológicamente activas que incluyen, pero no se limitan a, una o más citoquinas, factores de crecimiento, y / o factores angiogénicos, o una combinación de los mismos. Ejemplos de tales moléculas biológicamente activas se proporcionan en la Tabla 1.

**TABLA 1**

<b>Citoquina</b>	<b>Fuente principal</b>	<b>Células diana y / o efectos principales</b>
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	Plaquetas	Movilidad y proliferación de células pleitrópicas
Factor de crecimiento de transformación "alfa" (TGFα)	Macrófagos, células epidérmicas	Movilidad y proliferación de células pleitrópicas
Factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina	Macrófagos	Movilidad y proliferación de células pleitrópicas
Factor de crecimiento de fibroblastos básico	Macrófagos, células endoteliales	Angiogénesis y proliferación de fibroblastos
Factor de crecimiento de fibroblastos ácido	Macrófagos, células endoteliales	Angiogénesis y proliferación de fibroblastos
Factor de crecimiento de queratinocitos	Fibroblastos	Movilidad y proliferación de células epidérmicas

(continuación)

Citoquina	Fuente principal	Células diana y / o efectos principales
Familia del factor de crecimiento de transformación $\beta$ (TGF $\beta$ )		Fibrosis y resistencia a la tracción incrementada
Factor de crecimiento de transformación $\beta_1$ y $\beta_2$ (TGF $\beta_1$ y TGF $\beta_2$ )	Plaquetas, Macrófagos	Movilidad de células epidérmicas, quimiotaxis de macrófagos y fibroblastos, síntesis y remodelación de la matriz extracelular
Factor de crecimiento de transformación $\beta_3$ (TGF $\beta_3$ )	Macrófagos	Efectos anticicatrices
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Plaquetas, Macrófagos, células epidérmicas	Proliferación y quimioatracción, de fibroblastos, quimioatracción y activación de macrófagos
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Células epidérmicas, Macrófagos, células endoteliales	Angiogénesis y aumento de permeabilidad vascular
VEGFA	Células endoteliales de vasos sanguíneos	Migración de células endoteliales y formación de vasos sanguíneos
VEGFB	Células endoteliales de vasos sanguíneos	Migración de células endoteliales y formación de vasos sanguíneos
VEGFC	Células endoteliales de vasos linfáticos	Migración de células endoteliales y formación de vasos linfáticos
VEGFD	Células endoteliales de vasos linfáticos	Migración de células endoteliales y formación de vasos linfáticos
Factor de necrosis tumoral "alfa" (TNF $\alpha$ )	Neutrófilos	Expresión pleiotrópica de factores de crecimiento
Interleuquina-1 (IL-1)	Neutrófilos	Expresión pleiotrópica de factores de crecimiento
Factor de crecimiento 1 de tipo insulina	Fibroblastos, células epidérmicas	Reepitelización y formación de tejido de granulación
Factor de estimulación de colonias (CSF-1)	Células múltiples	Activación de macrófagos y formación de tejido de granulación
Factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF)	Células múltiples	Activación de macrófagos y formación de tejido de granulación

La columna 1 de la Tabla 1 indica las moléculas biológicamente activas adecuadas. Columna 2 muestra la fuente principal de la molécula biológicamente activa. Finalmente, Columna 3 muestra las células Diana y / o efecto principal de la molécula biológicamente activa.

- 5 Fibroblastos y queratinocitos secretan naturalmente una amplia disposición de los factores de crecimiento y citoquinas. Un sumarios de la secreción de diversas proteínas se muestra en la Tabla 2:

TABLA 2

Citoquinas	Queratinocitos	Fibroblastos
Angiopoyetina	Sí	Sí
EGF	Sí	Sí
Endotelina	Sí	No
FGFs	Sí	Sí
FGF-7/KGF	Sí	Sí

(continuación)

Citoquinas	Queratinocitos	Fibroblastos
IFN- $\alpha/\beta$	No	Sí
IGF-1	No	Sí
IL-1 $\beta$	Sí	Sí
IL-6	Sí	Sí
IL-8	Sí	Sí
IL-18	Sí	No
MCP-1	No	Sí
MIP-1 $\alpha$	No	Sí
MIP-2	No	Sí
PDGF	No	Sí
SLPI	Sí	No
TGF- $\alpha$	Sí	Sí
TGF- $\beta$ s	Sí	Sí
TNF- $\alpha$	Sí	Sí
VEGF	Sí	Sí

(Véase Singer, A. y Clark, R. (1999) "Cutaneous Wound healing" The New England Journal of Medicine 341: 738: 746.)

5 Control de la administración de la molécula biológicamente activa secretada se puede lograr mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la expresión de productos de genes múltiples se puede controlar por un único sistema promotor. De manera alternativa, la expresión de productos de genes múltiples se pueden controlar por sistemas promotores múltiples, cada sistema promotor regulado o bien constitutivamente, por cambio de genes o por alguna combinación de ambos. Además, el control sobre la secreción de una molécula biológicamente activa particular se puede lograr por la regulación hacia arriba de la expresión  
10 génica de tipo salvaje.

Existen numerosos procedimientos de transfección bien conocidos para introducir material genético en las células diana. Éstos incluyen el uso de policones tal como DEAE-dextrano (véase McCutchan, et al., J. Natl. Cancer Inst. 41:351 - 57 (1968) y Kawai et al., Mol. Cell. Biol. 4: 1172 - 74 (1984)); precipitación conjunta por fosfato de calcio (véase Graham et al., Virology 52: 456 - 67 (1973)); electroporación (véase Neumann et al, EMBO J. 7: 841 - 45 (1982)); lipofección (véase Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 - 17 (1987)); vectores de retrovirus (véase Cepko et al., Cell 37: 1053 - 62 (1984)); y microinyección (véase Capecchi et al., Cell 22: 479 - 88 (1980)).  
15

Además, los expertos en la técnica reconocerán que también se puede emplear cualquier otro procedimiento adecuado para la administración de una molécula biológicamente activa en los tipos de células de acuerdo con la invención.

20 Usando cualquiera de los procedimientos de transfección anteriormente mencionados, el control sobre la secreción de una diversidad de moléculas biológicamente activas se puede lograr mediante el empleo de cualquier número de tipos de células que secretan las diversas moléculas biológicamente activas.

De manera adicional, los tipos de células de la presente invención pueden ser o bien mitóticamente activas o mitóticamente inactivas. El término "mitóticamente activa" se usa para describir las células que experimentan activamente mitosis. De manera inversa, "mitóticamente inactiva" se usa para describir las células que no experimentan activamente mitosis. Las células mitóticamente activas se pueden detener en crecimiento por cualquier medio conocido en la técnica. A modo de ejemplo no limitante, las células se pueden detener en crecimiento mediante medios químicos, tal como, por ejemplo, por la administración de mitomicina C. De manera adicional, los tipos de células se pueden detener en crecimiento por exposición a luz UV, rayos X, o radiación ( $\gamma$ ).  
25

En una realización preferida, los tipos de células se detienen en crecimiento mediante exposición a radiación gamma. Es importante indicar que, por ejemplo, células de fibroblastos humanas, mitóticamente inactivadas, se diferencian finalmente y por lo tanto cambian el patrón de la expresión y secreción de polipéptidos (Francz, Eur. J. Cell. Biol. 60: 337 - 45 (1993)). Como un ejemplo adicional, la diferenciación de queratinocitos usualmente depende de las condiciones de cultivo (incluyendo, por ejemplo, la composición de medio de cultivo, la concentración de  $Ca^{2+}$ -y si las células están cultivadas en la interfase aire-líquido), sin embargo, los queratinocitos también se pueden inducir para diferenciarse, por ejemplo, por mitomicina C.

Los tipos de células de acuerdo con la invención se describen en las reivindicaciones.

Las células de estroma que incluyen, por ejemplo, fibroblastos, se pueden aislar mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, fibroblastos se pueden derivar de órganos, tal como piel, hígado, y páncreas. Estos órganos se pueden obtener por biopsia (cuando sea apropiado) o después de autopsia. Específicamente, se pueden obtener cantidades suficientes de fibroblastos bastante convenientemente de reducción de mama, prepucio, o cualquier órgano de cadáver apropiado.

Fibroblastos se pueden aislar fácilmente mediante disgregación de un órgano o tejido fuente apropiado. Por "órgano o tejido fuente" se entiende el órgano o tejido a partir del que se obtienen las células. La disgregación se puede realizar fácilmente usando las técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Ejemplos de tales técnicas incluyen, pero no se limitan a disgregación mecánica y / o tratamiento con enzimas digestivas y / o agentes quelantes que debilitan las conexiones entre células vecinas haciendo por lo tanto posible dispersar el tejido en una suspensión de células individuales sin rotura de células apreciable. De manera específica, la disociación enzimática se puede realizar mediante troceado del tejido y tratando el tejido troceado con cualquiera de numerosas enzimas digestivas, o bien solas o en combinación. Las enzimas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, tripsina, quimiotripsina, colagenoasa, elastasa, hialuronidasa, ADNasa, pronasa, y / o dispasa. La rotura mecánica se puede realizar por numerosos procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, el uso de molinos, mezcladores, tamices, homogenizadores, celdas de presión, insonators o trituración. Véase Freshney, Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique, 2ª Ed., A.R. Liss, Inc., New York, 1987, Capítulo. 9, p. 107 - 26.

Una vez que se ha reducido el tejido fuente a una suspensión de células individuales, la suspensión se debe fraccionar en subpoblaciones a partir de las cuales se recuperan fibroblastos y / u otras células de estroma y / o elementos. El fraccionamiento se puede lograr usando técnicas estándar para la separación de células que incluyen, pero no se limitan a, clonación y selección de tipos de células específicos, rotura selectiva de células no deseadas (selección negativa), separación basada en la capacidad de aglutinación diferencial de células en la población mixta, procedimientos de congelación - descongelación, propiedades de adherencia diferencial de las células en la población mixta, filtración, centrifugación convencional y zonal, levigación centrífuga (centrifugación contracorriente), separación por gravedad unitaria, distribución en contracorriente, electroforesis y clasificación de células activada por fluorescencia -. Véase Freshney, Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques, 2ª Ed., A.R. Liss, Inc., New York, 1987, capítulo 11 y 12, p. 137 - 68. Los expertos en la técnica reconocerán que también se pueden usar otra técnica (s) de fraccionamiento de células adecuada (s).

Preferiblemente, el aislamiento de fibroblastos se realiza mediante explantación de piezas de piel de acuerdo con el procedimiento de Sly and Grubb. Véase Sly et al., Methods Enzymol. 58: 444 - 50 (1979).

Fibroblastos de órganos o tejidos de fuente diferente (que incluyen, por ejemplo, piel, hígado, y páncreas) también se pueden emplear en los procedimientos y composiciones de la invención. Además, los expertos en la técnica reconocerán que cualquiera de tales fibroblastos se puede modificar por ingeniería genética para secretar diferentes cantidades de una molécula o moléculas biológicamente activa (s).

Como se usa en el presente documento, el término "preparación de células" se refiere a la mezcla que se produce por combinación de una preparación de células que secretan una o más moléculas biológicamente activas y una preparación de los materiales extracelular o de otra matriz. Por ejemplo, una preparación de células de acuerdo con la invención se produce por la combinación de una preparación de trombina/células y una preparación de fibrinógeno. En algunas realizaciones, la mezcla resultante da como resultado la polimerización, produciendo por lo tanto una matriz curada. De manera alternativa, la combinación resultante puede producir una matriz altamente viscosa, no curada. La preparación de células resultante puede estar en la forma de una pasta. Los expertos en la técnica reconocerán que como se usa en el presente documento, el término "preparación de células" abarca un espectro de mezclas que varía entre una mezcla viscosa, no curada (es decir, una pasta) a una v polimerizada, curada. Las diferencias en la concentración de cada preparación así como las condiciones de cultivo pueden influir en la viscosidad y / o el grado de polimerización de la preparación de células resultante. Por ejemplo, en una realización de la invención, la combinación del fibrinógeno y las preparaciones de trombina/células se administran por pulverización a un sitio de herida para formar una matriz celular irreversible, polimerizada. Sin embargo, los expertos en la técnica también reconocerán que otras combinaciones pueden dar como resultado una matriz celular viscosa, no curada.

La densidad de células y la concentración de la matriz extracelular puede variar para la aplicación clínica deseada. Por ejemplo, ciertas heridas pueden requerir mayor o menor densidades de células y / o preparaciones de consistencia diferente. Las preparaciones de células resultantes pueden estar en la forma de una pasta de una células o en la forma de una matriz curada. La determinación de la densidad de células apropiada y concentración de la ECM está dentro de la rutina de los expertos en la técnica. La suspensión de células puede proceder de un tipo de célula o puede comprender una mezcla de diferentes tipos de células. Por ejemplo, la mezcla de células puede incluir 50% de queratinocitos y 50% de fibroblastos. Sin embargo, la relación de queratinocitos a fibroblastos puede variar, por ejemplo, 1:1, 1:4, 1:9, 1:24 etc. sin alterar la formación o la función de la preparación de células. De manera alternativa, la mezcla de células puede contener solamente queratinocitos o solamente fibroblastos (es decir, la relación de queratinocitos a fibroblastos puede ser 1:0 ó 0: 1). Además, la suspensión puede comprender más de dos tipos de células diferentes. Los porcentajes de cada tipo de células en la suspensión celular puede variar dependiendo del uso propuesto para la preparación de células. Los tipos de células también se pueden proinducir o cocultivar *in vitro* con el fin de optimizar la respuesta de cicatrización en la herida. Por ejemplo, fibroblastos se pueden preincubar con TGF-beta (entre 0,1 y 30 ng/ml de medio) durante 1 a 21 días antes de la aplicación a la herida.

La preparación de células de la invención se prepara a partir de dos componentes. El primero, mencionado en el presente documento como "componente nº 1" es el componente fibrinógeno. El segundo, denominado en el presente documento como "componente nº 2" es el componente células + trombina. Componente nº 2 puede opcionalmente contener un crioprotector. La preparación de células de la invención se forma mediante coagulación de proteínas en plasma (incluyendo fibrinógeno) en la presencia de trombina. Esta coagulación debida principalmente a la formación de una malla de fibrina polimerizada, que imita la formación de un coágulo de sangre. Trombina convierte el fibrinógeno en fibrina mediante escisión enzimática. Calcio acelera la actividad microlítica de trombina. De hecho, la combinación de fibrinógeno y trombina da como resultado una "reacción de polimerización". Tras la mezcla de estos materiales, las células llegan a estar atrapadas en la preparación de células resultante, que puede ser una pasta o una matriz curada, dependiendo de las concentraciones de los componentes, el número de células, las condiciones de cultivo, etc. De manera adicional, en cualquiera de las preparaciones de células de la invención, cualquiera o todos los componentes también pueden contener proteínas o compuestos químicos adicionales, que no afectan a la formación o función de la preparación de células, tal como proteínas (es decir, Albúmina), inhibidores de proteína (es decir, Aprotinina), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), y otras moléculas típicamente usadas como estabilizantes para las preparaciones de células. En otras realizaciones de la invención, el primer componente de la preparación de células puede contener trombina y el segundo componente puede contener células más fibrinógeno. Los expertos en la técnica reconocerán que, en esta realización, la combinación de componente nº 1 y componente nº 2 también dará como resultado una preparación de células útil para la regeneración tisular.

### 35 Procedimientos de Administración

En una realización preferida, la invención implica una combinación de líneas celulares humanas alogénicas de fibroblastos y queratinocitos mezcladas con materiales ECM que forman una pasta de células viscosa para adherirse a una herida. En esta realización, las líneas celulares preferiblemente no están modificadas por ingeniería genética. Las líneas celulares pueden estar mitóticamente inactivadas mediante cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Preferiblemente, la pasta resultante es tanto biodegradable como biocompatible.

Como se ha descrito previamente, líneas celulares inmortalizadas de fibroblastos y queratinocitos también serían realizaciones preferidas. El procedimiento de inmortalización preferido sería directamente mediante la adición del gen para TERT en las células de queratinocitos y fibroblastos primarias de manera que el gen TERT se establece de manera constitutiva. Además, una inmortalización transitoria que usa una secuencia de transporte de dominio de proteína (TAT, VP22, MTS, etc. unida a la proteína TERT podría ser más preferible porque el gen no está permanentemente insertado en la célula inmortalizada pero se añade en su lugar como una proteína de fusión al medio de crecimiento. De esta forma, la línea celular se puede expandir, depositar, y seleccionar de manera continua por propiedades estables (velocidad de crecimiento, secreción de factor, etc.), sin la necesidad continua de revalidación de nuevas fuentes de células primarias. Líneas celulares inmortalizadas de esta forma pueden estar preferentemente mitóticamente inactivadas antes de la aplicación al sitio de la herida o reparación de tejidos en forma de una pasta, preparación de células, mezcla de matriz biológica, o unida o adsorbida a un apósito de herida.

La presente invención tiene aplicaciones clínicas humanas y veterinarias. La preparación de células de la invención se pueden usar para tratar seres humanos y animales no humanos, incluyendo un primate no humano, ratón, rata, perro, gato, cerdo, oveja, vaca, o caballo. La preparación de células de acuerdo con la invención se puede usar para la regeneración tisular tal como, por ejemplo, en tratamiento de heridas cutáneas o en tratamiento de peritonitis.

Tales composiciones pueden comprender la preparación de células y un vehículo adicional captable. Como se usa en el presente documento, "vehículo biológicamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los disolventes,

medios de dispersión, revestimiento, antibacterianos, y agentes antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de absorción, y similares, compatibles con la administración de compuestos biológicos. Los vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo, que se incorpora en el presente documento por referencia. Los ejemplos preferidos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua; solución salina; solución de dextrosa; albúmina sérica humana; HBSS y otras soluciones tamponadas (incluyendo aquellas con y sin  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ) conocidos por los expertos en las técnicas relevantes; y medios basales. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conocen bien en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir un recipiente, envase, kit, o dispensador conjuntamente con las instrucciones para la administración.

El régimen de dosificación se selecciona de acuerdo con una diversidad de factores que incluyen la especie, edad, peso, sexo, y condición médica del paciente; tipo y gravedad de la afección a tratar; la vía de administración; y las células particulares empleadas. Un médico o veterinario ordinariamente experto puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz requerida para evitar, contrarrestar, o detener el progreso de la afección.

La preparación de células de la invención se puede administrar por vía tópica a la herida en necesidad de tratamiento. El componente trombina + célula (componente nº 2) en la forma de una pulverización se puede mezclar con el componente fibrinógeno (componente nº 1) en la forma de una pulverización antes, durante, o después de la aplicación a la herida.

La preparación de células de la invención se administra mediante la pulverización de los componentes de la preparación sobre el área de la herida. Las bombas de pulverización adecuadas para uso en la administración de la preparación de células de la invención incluyen las usadas para otras aplicaciones médicas, incluyendo pulverizaciones nasales y por la garganta. De manera adicional, la preparación de células se pueden aplicar usando una pulverización generada por gases inertes comprimidos en lugar de usar una bomba de pulverización. Por ejemplo, se pueden usar pequeños frascos de gases inertes de calidad médica tales como aire y / o nitrógeno. La presión del gas se puede usar para propulsar fluidos a través de un pequeño orificio, generando por lo tanto una pulverización de niebla fina. La presión puede actuar directamente sobre el fluido o una caña de presión puede extraer fluido en una corriente de aire, que eventualmente llegará a ser una pulverización.

En otra realización, la preparación de células de la invención se puede administrar mediante pulverización en forma de un producto de dos componentes que se aplica a una úlcera crónica en un proceso secuencial, de dos etapas. En esta realización, el primer componente es una suspensión de fibrinógeno en HBSS (sin  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ) y el segundo componente es una mezcla de células (incluyendo fibroblastos y queratinocitos), trombina y crioprotectores en HBSS (con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ ). En esta realización, los dos componentes de la preparación de células se mezclan conjuntamente sobre el área de la herida diana. Ambos componentes se aplican a la úlcera crónica o la herida usando un aplicador de pulverización, tal como una bomba de pulverización. Por ejemplo, una bomba de pulverización se puede usar para administrar dosis precisas de ambos componentes durante el tratamiento de una úlcera o herida. El diseño real de la bomba de pulverización usada puede variar dependiendo del fabricante. Ejemplos de bombas de pulverización adecuadas incluyen por ejemplo pulverización nasal y de garganta. La bomba de pulverización se fabrica de un material que se puede esterilizar usando técnicas convencionales para evitar la contaminación de cualquier componente de la preparación de células.

Las dosis pulverizadas pueden variar entre aproximadamente 50  $\mu\text{l}$  y aproximadamente 150  $\mu\text{l}$  por pulverización, preferiblemente entre aproximadamente 100  $\mu\text{l}$  y aproximadamente 150  $\mu\text{l}$  por pulverización, lo más preferiblemente aproximadamente 130  $\mu\text{l}$  por pulverización. Para permitir una aplicación concentrada y más precisa del producto, la bomba de pulverización debe tener un mecanismo actuador de pulverización que produce un diámetro de pulverización estrecho en lugar de una pulverización de mayor diámetro. El mecanismo actuador de pulverización es el "brazo" que orienta y genera la pulverización mediante el tamaño del orificio. El área de la superficie de la úlcera crónica o herida cubierta por cada pulverización depende directamente de la distancia del actuador de la diana. Por ejemplo, cuanto más cerca está el mecanismo actuador de pulverización al área diana, más pequeña es el área de superficie cubierta por la pulverización. Del mismo modo, además cuanto más distante está el mecanismo actuador de pulverización de área diana, mayor es el área de superficie cubierta por la pulverización.

Preferiblemente, el área de superficie cubierta varía entre aproximadamente 11  $\text{cm}^2$  y aproximadamente 14  $\text{cm}^2$ . En una realización preferida, la distancia entre la boquilla de pulverización y diana es aproximadamente 6 cm. A esta distancia, usando un mecanismo actuador de pulverización de diámetro estrecho, una pulverización cubrirá un área se superficie de la herida de aproximadamente 12,6  $\text{cm}^2$ .

El número de células que están en contacto sobre el área diana del paciente (es decir, el número de células por

cm<sup>2</sup> de paciente) variará dependiendo de la concentración de cada uno de los componentes y la relaciones de queratinocitos a fibroblastos usada en el componente nº 2. Los expertos en la técnica reconocerán que la concentración de células en el segundo componente de la preparación de células puede variar entre aproximadamente 1x10<sup>3</sup> células/µl y aproximadamente 50x10<sup>3</sup> células/µl. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el número de células/µl de la preparación de células componente nº 2 puede variar entre aproximadamente 5x10<sup>3</sup> células/µl y aproximadamente 20x10<sup>3</sup> células/µl. De este modo, si se administran dos pulverizaciones de aproximadamente 130 µl/pulverización a un paciente, aproximadamente 1,3x10<sup>6</sup> y aproximadamente cerca de 5,2x10<sup>6</sup> células se administran al paciente.

Típicamente, el primer componente (fibrinógeno) se pulveriza en la diana seguido de pulverización del segundo componente (trombina + células). El orden de pulverización de los componentes se puede invertir. Sin embargo, es preferible aplicar primero el componente fibrinógeno y después posteriormente aplicar componente trombina + células, que opcionalmente puede contener un crioprotector. Una vez se pulveriza el componente células + trombina en el componente de fibrinógeno, los dos componentes comenzarán a gelificar, curar o polimerizar casi inmediatamente, permitiendo una distribución igual de células sobre el área diana. Cuando el componente células + trombina se aplica primero seguido por el componente fibrinógeno, el tiempo de retraso resultante permite que las células migren sobre el sitio de herida debido a los efectos de gravedad, que puede provocar que el componente células + trombina "corra" o "gotee" después de la aplicación, dependiendo del volumen aplicado. Esto, a su vez, podría potencialmente conducir a una distribución desigual de células tras la aplicación del componente fibrinógeno. Ya que la posterior aplicación del componente fibrinógeno conduce a la polimerización, esto puede dar como resultado la formación de una preparación de células desigual.

En otra realización, los componentes de la preparación de células se pueden administrar en forma de una pulverización que se mezcla con el aire antes de alcanzar el área diana. En tal realización, se pueden pulverizar dos componentes separados al mismo tiempo usando uno o dos mecanismos actuadores de pulverización. Las nieblas de pulverización de cada componente se combinan después en el aire, iniciando por lo tanto la polimerización antes que la preparación de células alcance el área diana (es decir, el sitio de la herida). Esta realización haría la preparación de células de la invención más fácil de aplicar, ya que requiere una sola pulverización para aplicar a las células e iniciar la polimerización de la fibrina.

#### Crioconservación

En algunas realizaciones, componente nº 2 células se puede crioconservar antes de uso en la preparación de células de la invención. En tales realizaciones, componente nº 2 contiene células + trombina + a crioprotector. Los expertos en la técnica reconocerán que, los términos "crioprotector" y "crioconservante" se usan indistintamente en el presente documento y cubre los agentes usados para lograr la crioconservación. Los crioprotectores adecuados incluyen, por ejemplo, glicerol, etilenglicol, y dimetil sulfóxido ("DMSO"). En diversas realizaciones, el crioprotector incluye, pero no se limita a una solución de glicerol al 10%, una solución de glicerol al 15%, una solución de glicerol al 15% y solución de albúmina sérica humana (HSA) al 5%. Los expertos en la técnica reconocerán que cualquier otro crioprotector y concentraciones de crioprotector conocidos en la técnica también se pueden usar.

Los crioprotectores usados en la presente invención pueden estar incluidos en los tampones que contienen el componente nº 2 de la preparación de células. En este protocolo, no se necesitan añadir proteínas extra. Del mismo modo, las células no se congelan en medio biológico. Eligiendo un a crioprotector con baja o ninguna toxicidad, no existe necesidad de lavar con agua o eliminar de otra manera el crioprotector de las células antes de uso. Esto permite la aplicación directa de la preparación de células después de la congelación.

Crioconservación facilita el transporte y almacenamiento a largo plazo de los componentes de la preparación de células de la invención. Las células crioconservadas (en el componente nº 2) se almacenan a una temperatura que varía entre aproximadamente -70°C y aproximadamente -196°C (si se usa nitrógeno líquido). Por ejemplo, las células crioconservadas se pueden almacenar en un congelador a -80°C o en fase de vapor de nitrógeno líquido a -160°C.

En un protocolo de crioconservación preferido, un vial que contiene la mezcla célula + trombina + crioprotector (componente nº 2) se cierra con un cierre de rosca de una manera estéril. El vial cerrado después se empaqueta (se sella herméticamente) dentro de una bolsa fabricada de un material que puede resistir temperaturas que varían entre -70°C y -196°C, que es la temperatura encontrada en la fase de vapor de nitrógeno líquido. Otras temperaturas de almacenamiento entre -120°C y -160°C se pueden encontrar en la fase de vapor de nitrógeno líquido. Viales o bolsas que contienen viales se colocan después dentro de un congelador de velocidad controlada empleada para la congelación de células y tejidos biológicos en un estante especial diseñado para insertarse dentro del congelador de velocidad controlada. Típicamente, los viales o bolsas se almacenas hacia arriba y se alinean en varias filas, de manera que exista espacio entre cada fila. Las filas se alinean en paralelo al flujo del vapor de nitrógeno líquido que pasa a través de la cámara para enfriar las muestras. El uso de tales bolsas ayuda a evitar la contaminación de los componentes durante la congelación y descongelación del componente nº 2.

## ES 2 377 962 T3

Después de cargar las cámaras, se inicia un ciclo de congelación, como sigue:

1. Comenzar a temperatura ambiente o 20°C, la cámara se enfría a -2°C por minuto hasta 4°C.
2. La cámara después se mantiene a 4°C durante 52 minutos para estabilizar todas las muestras a 4°C.
3. La cámara después se enfría a -1°C por minuto hasta -5°C.
- 5 4. La cámara después se enfría a -3°C por minuto hasta -12°C.
5. La cámara después se enfría a -7.5°C por minuto hasta -20°C.
6. La cámara después se mantiene a -20°C durante 15 minutos.
7. La cámara después se enfría a -1°C por minuto hasta -80°C.
8. La cámara después se mantiene a -80°C durante 60 minutos.
- 10 Las bolsas se retiran después del congelador y se almacenan o bien a -160°C o -80°C hasta el tiempo de uso.

Los expertos en la técnica reconocerán que el procedimiento exacto usado en el ciclo de enfriamiento se puede cambiar o mejorar según sea necesario. En general, se sabe bien que las células o tejidos se deben enfriar a una velocidad que varía entre aproximadamente -0.2°C/minuto y aproximadamente -5°C/minuto. Además, los intervalos de velocidad de enfriamiento de aproximadamente -0.5°C/minuto y aproximadamente -2°C/minuto son óptimos en la mayoría de los casos.

La velocidad de enfriamiento es especialmente crítica a medida que la temperatura se reduce hasta el punto de congelación de la solución de crioprotector usada. En la realización preferida descrita en el presente documento, el enfriamiento se acelera alrededor del punto de congelación de la solución. Esta caída global, rápida en la temperatura de la cámara se pretende que induzca el cambio de fase mediante la generación de una inestabilidad térmica que induciría la siembra de hielo. Es deseable controlar la siembra del proceso de transición de fase con el fin de iniciar la transición de fase de todas las muestras al mismo tiempo. La siembra del proceso de transición de fase se puede controlar mediante varios procedimientos, incluyendo la creación de una inestabilidad del punto térmico bien por (1) tocar una muestra con una sonda metálica enfriada en nitrógeno líquido o (2) expulsar un líquido frío (por ejemplo, nitrógeno líquido) en la muestra. (Véase patente de Estados Unidos números 6.347.525; 6.167.710; y 5.981.617).

Los expertos en la técnica reconocerán que también se pueden usar otros medios de control de la transición de fase. Por ejemplo, se puede usar cualquier técnica disponible que cree una inestabilidad en la solución superenfriada tal como estimulación mecánica (por ejemplo, una vibración pulsada).

En algunas realizaciones, la preparación de células de la invención se puede administrar en forma de un kit contenido en un único envase hecho de una bolsa de laminado de hojas de aluminio que resiste bajas temperaturas. Dentro de la bolsa exterior están dos bolsas más pequeñas, la primera con un vial que contiene el componente nº 1 (fibrinógeno) y el segundo con un vial que contiene el componente nº 2 (células + trombina + crioprotector). De manera alternativa, viales para los componentes nº 1 y nº 2 también se pueden envasar conjuntamente en una única bolsa o caja. Estas bolsas internas también están hechas de un material resistente a temperatura. Ejemplos de materiales adecuados para estas bolsas incluyen, pero no se limitan a, una bolsa de laminado de hojas de aluminio, papel recubierto, LDPE, Surlyn®, y una bolsa de laminado Kapton™ (Steripack, Irlanda). Los expertos en la técnica reconocerán que cualquier otro material adecuado también se puede usar para fabricar estas bolsas. El material usado para fabricar la bolsa debe tener una baja temperatura de inicio de sellado, alto comportamiento de barrera, y buena resistencia química. Además, debe ser adecuado para esterilización por radiación para evitar la contaminación de los componentes de la preparación de células. Un ejemplo de la composición y propiedades típicas de una bolsa adecuada se proporciona en las Tablas 3 y 4.

**TABLA 3**

<b>ESTRUCTURA</b>	<b>Espesor (micrómetros)</b>	<b>Peso (g/m<sup>2</sup>)</b>
Papel	-	50
Polietileno	13	12
Hoja de aluminio	9	25
Surlyn®	-	23

TABLA 4

PROPIEDAD	UNIDADES	Valor (típico)
Resistencia a tracción (MD)	KN/m <sup>2</sup>	> 50,0
Resistencia a tracción (CD)	KN/m <sup>2</sup>	> 20,0
Elongación (MD)	%	> 1,0
Elongación (CD)	%	> 1,0
Resistencia a laminación	T: 140°C, P: 4 bar (400 kPa) , t: 0,3 seg.	> 5,0
Velocidad de transmisión de vapor de agua	g/ m <sup>2</sup> .d @ 38°C, 90% H. R.	< 0,5
Velocidad de transferencia de de oxígeno (O <sub>2</sub> )	cc/ m <sup>2</sup> .d.atm@ 23°C, 50% H. R.	< 2,0

5 Los parámetros de sellado para una bolsa adecuada dependen del equipo de sellado particular usado y su compatibilidad con la capa selladora del sustrato secundario. Sin embargo, los parámetros típicos para sellado incluyen: temperatura = 100 - 140°C; tiempo de residencia = 0,30 – 0,75 seg.; y presión = 60 - 80 psi. (413,69 - 551,58 kPa)

10 En otra realización, los viales se pueden sellar en un recipiente rígido, transparente, fabricados mediante el uso de un polímero resistente a temperaturas por debajo de -70°C hasta tan baja como -196°C. Una diversidad de tipos diferentes de viales se puede usar para congelar los componentes n° 1 y n° 2. En una realización preferida, se emplea un vial novedoso (5) tal como se muestra en la FIG. 6a y FIG. 6b. Este vial se usa para congelar los componentes de la preparación de células de la invención. Tras la descongelación, tapón roscado (4) que cierra el vial se puede reemplazar con un aplicador de bomba de pulverización. En una realización, la botella se puede fabricar de polipropileno, que es resistente a las bajas temperaturas empleadas en el protocolo de crioconservación.

15 El espesor de la pared de este vial (1) debe ser aproximadamente 0,8 mm para facilitar la transferencia de calor/frío a través de la pared, que es importante para los procedimientos tanto de congelación como descongelación. De manera adicional, el vial se puede diseñar para estar vertical después que se haya enroscado una bomba de pulverización, y el fondo del vial (2) es cónico (3) para facilitar el vaciado del contenido.

20 Una bomba de pulverización diseñada para ser usada con este tipo de vial se fabrica por la compañía Valois. Cada pulverización distribuye un volumen de 130 µl de producto. El actuador de pulverización, que es el "brazo" que orienta y genera la vía de pulverización the tamaño de orificio, se puede modificar de manera que el "brazo" se puede orientar en las direcciones diferentes de la posición horizontal, para ayudar en la administración tópica que permite la aplicación por pulverización en una superficie horizontal sin invertir la botella. En otra realización, se pueden emplear otros diseños de bomba de pulverización que permiten que la pulverización funciones cuando se invierte la botella.

25

Los componentes crioconservados de la preparación de células de la invención se pueden transportar, almacenar, y / o usar como sigue. Los componentes se pueden transportar en forma de un kit congelado en hielo seco a temperatura de aproximadamente -70°C y aproximadamente -80°C. La bomba se puede transportar a temperatura ambiente. Tras la llegada el kit se debe almacenar en un congelador a -80°C o a -160°C hasta uso. Para uso, la bolsa externa del kit se abre y las dos bolsas más pequeñas que contienen el componente n° 1 (fibrinógeno) y n° 2 (células + trombina + crioprotector) se retiran y se descongelan en un baño de agua que se calienta hasta un máximo de 37°C. Los expertos en la técnica reconocen que las bolsas sirven para evitar agua en el baño de agua de la contaminación de los componentes de la preparación de células. Una vez el contenido de los viales se ha descongelado, las bolsas se pueden retirar del baño de agua, se desinfecta (si se desea), y se abre. La parte superior roscada de cada vial se retira después y se reemplaza con un aplicador de pulverización roscado, y los

30

35 componentes de la preparación de células después están listas para la aplicación al paciente.

La invención se describirá además en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

#### Ejemplo 1: Aislamiento de Queratinocitos y Fibroblastos

- Queratinocitos y fibroblastos se pueden aislar después de escisión de la epidermis de la dermis usando una enzima tal como dispasa o termolisina. La epidermis aislada se puede incubar con tripsina para obtener una única suspensión de células de queratinocitos, que después se puede sembrar en placas de cultivo y amplificarse para crear un banco de queratinocitos primarios. La dermis aislada se puede incubar con una enzima de disociación tal como colagenasa para obtener suspensiones únicas de células de fibroblastos listas para sembrarse y amplificarse o trocearse y transferirse en una placa de cultivo, y cultivarse hasta que los fibroblastos han migrado del tejido. Estas células se pueden después recoger después del tratamiento por tripsina y después se amplificó para establecer un banco de células de fibroblastos. Los queratinocitos y fibroblastos humanos primarios aislados de esta manera se pueden usar para la preparación de mezclas de células y fibrina.
- El aislamiento de fibroblastos también se puede llevar a cabo como sigue: muestras de tejido recientes se lavaron abundantemente y se trocearon en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) con el fin de retirar el suero. El tejido se incubó entre 1 y 12 horas en una solución preparada recientemente de una enzima de disociación tal como tripsina. Después de tal incubación, las células disociadas se suspenden, se sedimentan por centrifugación y se siembran en placas de cultivo. Todos los fibroblastos se unirán antes que otras células, por lo tanto, se pueden aislar y desarrollar selectivamente células de estroma apropiadas. Los fibroblastos aislados después se pueden desarrollar hasta confluencia, y se cultivan en serie o se almacenan congelados en nitrógeno líquido (véase, Naughton et al., 1987, J. Med. 18 (3&4): 219 - 250). Los fibroblastos de subpoblaciones de fibroblastos tal como células de papila dérmica o miofibroblastos se pueden aislar a partir del cultivo de crecimiento hacia el exterior del explante. Una vez aisladas, las células de estroma están listas para mezclar con una pasta de matriz extracelular (por ejemplo, fibrina).

### Ejemplo 2: Composición de los componentes de la preparación de células de la invención

#### Componente nº 1

- Este componente se puede preparar realizando una dilución cuatro veces de la Solución de Proteínas Sealer en el Tisseel VH Fibrina Sealant (Baxter). Después de dilución, la concentración de los componentes en la solución de Proteínas Sealer era como sigue:

Fibrinógeno:	18,75 mg/ml - 28,75 mg/ml
Inhibidor de Fibrinólisis (Aprotinina):	750 KIU/ml
Polisorbate:	0,05 mg/ml - 0,1 mg/ml
Sodium Chloride:	0,5 mg/ml - 1,0 mg/ml
Trisodium Citrate:	1,0 mg/ml - 2,0 mg/ml
Glicina:	3,75 mg/ml - 8,75 mg/ml

- La Solución de Proteínas Sealer se diluyó en solución salina tamponada de Hank (HBSS) sin  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ . La presencia de estos dos iones condujo a la formación de precipitados durante el proceso de congelación y descongelación.

- Los expertos en la técnica reconocerán que el Tisseel Sealant se puede suplementar con otras preparaciones de fibrinógeno y aprotinina disponibles comercialmente para lograr resultados similares. Además, fibrinógeno también se puede diluir a otras concentraciones, dependiendo de la forma de administración, para potenciar las características de polimerización.

#### Componente nº 2

Este componente crioprotegido de puede preparar como sigue:

Componentes	Concentración final
Trombina (Baxter Tisseel):	10% en volumen
Glicerol	15% en volumen
Albúmina sérica humana	5% en volumen

HBSS (con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>)

Usado para resuspender estos componentes

Después de dilución, la solución de trombina obtenida de Baxter contribuye a la siguiente solución crioprotegida:

	Trombina:	50 IU/ml
5	Proteína Total:	4,5 - 5.5 mg/ml
	Cloruro sódico:	0,8 - 1.2 mg/ml
	Glicina:	0.24 - 0,36 mg/ml
	CaCl <sub>2</sub> :	4 µmol

10 HBSS con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> fue el diluyente elegido.

La mezcla y concentración de células deseada (relación) se volvió a suspender en solución crioprotegida para obtener el componente nº 2. Se han considerado diversas relaciones de queratinocito:fibroblasto, incluyendo 1:1, 1:3, 1:4, 1:9, tan alto como 1: 50. Además, diversas concentraciones finales de células en el componente nº 2 considerado han sido 1 millón, 2,5 millones, 5 millones, 10 millones, 20 millones, y 50 millones células/ml (concentración final).

### Ejemplo 3: Ensayo de la dosis eficaz de Mitomicina C

En trabajo previo muestra concentraciones de mitomicina C (MMC) para que la detención de crecimiento de fibroblastos 3T3 sea 2 µg/ml (Rheinwald and Green, Cell 6:331-43 (1975)) y para que la detención de crecimiento de fibroblastos humanos sea 8 µg/ml (Limat et al., J. Invest. Dermatol. 92: 758 - 62 (1989)).

20 La línea celular defibroblastos de rata (CRL 1213), la línea celular de fibroblastos de rata transfectada por FGF1 (1175/CRL 1213), la línea de fibroblastos inmortalizada de telomerasa (MDX12), y los fibroblastos humanos primarios (EDX1) se detuvieron en crecimiento cada una usando el siguiente procedimiento. Fibroblastos se desarrollaron en DMEM + 10% FCS, 25 mM Hepes, 1 mM piruvato, 2 mM L-Gln, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin en matraces T75. En la confluencia, las células se desprendieron y se sembraron a una densidad de 25 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>, se incubaron después durante 48 h, después se trataron con mitomicina C (MMC) a 0, 2, 4, 8, 12 µg/ml durante 5 h. Las células después se enjuagaron con PBS y se desprendieron con tripsina al 0,05% / EDTA al 0,02%. Las células remanentes se sembraron a densidades de 100 a 5000 células/cm<sup>2</sup> en matraces T25 respectivamente (10 matraces para cada densidad). Estas células se incubaron a 37°C con 2 cambios de medio por semana.

30 La eficacia de la detención de crecimiento se midió semanalmente contando las células (usando un hemacitómetro) cultivadas en los matraces sembradas a una densidad de 5000 células/cm<sup>2</sup> y mediante inspección de aparición de las colonias que aparecen en los matraces sembrados a una densidad de 100 células/cm<sup>2</sup>. También se examinaron los cambios en la morfología celular. Una concentración de 8 µg/ml de MMC era suficiente a detener el crecimiento de los fibroblastos primarios humanos (EDX1) y la línea de fibroblastos humanos 35 inmortalizados humano hTERT (MDX12) de acuerdo con los datos previos (Limat et al., J. Invest. Dermatol. 92: 758 - 62 (1989)). La línea de fibroblastos de rata (CRL 1213) mostró una toxicidad para concentraciones de MMC por encima de 4 µg/ml, mientras que 2 µg/ml de MMC probó que era óptima para detener el crecimiento de estas células. La línea celular de fibroblasto de rata (1175/CRL 1213) transfectada con el gen FGF1 se detuvo el desarrollo a una concentración de 1 µg/ml de MMC. Las concentraciones por debajo de 1 µg/ml no era eficaz y mayores 40 concentraciones de MMC eran progresivamente tóxicas. Los fibroblastos tratados con Mitomicina C (con la dosis apropiada de mitomicina-C), recuperados de almacenamiento criogénico por descongelación, mostró una recuperación de células de al menos 50% (de acuerdo con Limat et al., In Vitro Cell Dev. Biol. 26: 709 - 12 (1990)).

### Ejemplo 4: Ensayo de la dosis eficaz de la Radiación gamma en Fibroblastos y Queratinocitos

Para medir el efecto de la radiación gamma (γ) sobre la actividad mitótica de los fibroblastos tratados, se empleó un 45 ensayo de proliferación de células BrdU que funciona en un formato de 96 pocillos (Oncogene Research Products). Las células de fibroblastos primarios no inmortalizadas se trataron con radiación a diversas dosis, incluyendo 0, 60, 70, y 80 rayos G. Las células se sembraron después a una densidad de 5.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. Los controles irradiados y no irradiados se mantuvieron en cultivo durante períodos que duraban entre 15 y 30 días. En cada uno de estos momentos, la actividad mitótica se midió usando un ensayo de incorporación 50 de BrdU en el que la incorporación de BrdU en el ADN se ensayó inmunquímicamente y se midió mediante sus

absorbancia a 450 nm.

En la FIG. 1, las células no irradiadas tratadas con BrdU sirvieron como un control positivo para cada experimento. Las células no irradiadas que no se trataron con BrdU sirvieron como absorbancia de fondo, que se restó de la absorbancia a 450 nm para cada muestra (0, 60, 70, y 80 rayos G) y los datos normales se normalizaron estableciendo el control positivo a 100% con relación a la incorporación de BrdU. En la FIG. 1, está claro que el tratamiento con radiación y a niveles de 60 rayos G y superior induce fibroblastos primarios en un estado postmitótico. Se consideró un total de 3 muestras para cada condición. Los datos se muestran como promedio  $\pm$  SEM.

En la FIG. 2, la viabilidad de las células después de tratamiento por radiación gamma ( $\gamma$ ) se determine mediante la determinación de la adhesión de las células a las superficies de células de cultivo normales. Las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos a una concentración de 9.500 células/cm<sup>2</sup> o 95.000 células pocillo. Cuatro horas después de la siembra de las células, se reemplazó el medio con un medio reciente que contenía 50  $\mu$ g/ml de Rojo Neutro y las células se incubaron durante 2 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Los pocillos después se enjuagaron dos veces con NaCl 0,9% y se secaron durante toda una noche. El día siguiente, se disolvió el tinte usando una mezcla de ácido acético 1:1 (2%) y etanol (95%). Cada pocillo se incubó en 1 ml de esta solución a temperatura ambiente durante 15 minutos después de lo cual se midieron 200  $\mu$ l de la mezcla para determinar el contenido en tinte a 540 nm. No se observó diferencia significativa entre la adherencia de células tratadas contra no tratadas indicando que la radiación gamma ( $\gamma$ ) no afectan a la viabilidad celular y que las células pueden unirse a una superficie de cultivo después de la radiación gamma ( $\gamma$ ). Cada punto de dato es la medición media de 6 pocillos separados por tres. Los datos se muestran como la media  $\pm$  DE.

Radiación gamma ( $\gamma$ ) a 80 Gy también se evaluaron para determinar su capacidad de inducir la diferenciación de queratinocitos humanos primarios en un estado postmitótico. Los queratinocitos irradiados se sembraron sobre una capa células alimentadoras de fibroblastos detenidos en crecimiento (irradiadas con gamma ( $\gamma$ ) a 70 Gy). Las células alimentadoras a una densidad de 5.000 células/cm<sup>2</sup> y los queratinocitos 12.500 células/cm<sup>2</sup>. El desarrollo de queratinocitos y fenotipo se siguieron durante 3 semanas después de ello mediante observación usando un microscopio invertido. Durante este período, se observó que los queratinocitos adoptaban un fenotipo diferente, incrementando las células su tamaño y área de unión. Los queratinocitos cultivados de esta manera no eran capaces de dividirse y cubrir la superficie de cultivo, sino que en su lugar permanecían o bien aislados o en pequeños racimos, indicando que la radiación había inducido células en un estado postmitótico.

**Ejemplo 5: Ensayo de densidades de células con pasta de Fibrina: Secreción de Factores de crecimiento y Citoquinas por mezclas de Queratinocitos y Fibroblastos en una matriz de Fibrina**

Queratinocitos y fibroblastos primarios humanos se detuvieron en desarrollo por radiación gamma ( $\gamma$ ) a 80 Gy antes de la formulación. Se mezclaron preparaciones recientes de queratinocitos y fibroblastos primarios humanos a una relación de 1:9 a concentraciones finales que incluían 2,5, 5, 10, 20 y 40 millones de células/ml en una suspensión que contenía trombina al 10% (Tisseel, Baxter) + glicerol al 15% + albúmina sérica humana al 5%. En un Segundo vial, se preparó una solución de fibrinógeno al 25% (Tisseel, Baxter). Se preparó una "pasta" de células y fibrina en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos por pulverización conjuntamente 1 pulverización (130  $\mu$ l) de la suspensión de célula + trombina con 1 pulverización (130  $\mu$ l) de la suspensión de fibrinógeno. Se midió la secreción de diversos factores de crecimiento y citoquinas por estas células en un medio durante el día 2 después de la preparación de las células en la matriz de fibrina.

Los datos mostrados en la Tabla 5 representa un promedio de 5 puntos de datos (muestras) individuales (samples) para cada condición presentada.

**TABLA 5**

Concentración de células	GM-CSF (pg)		VEGF (pg)		KGF (pg)		HGF (pg)		IL-1 beta (pg)	
	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM	Promedio	SEM
2,5 millones/ml	9	5	1002	80	90	6	1869	144	29	4
5 millones/ml	42	14	3528	385	207	9	3533	417	58	6
10 millones/ml	373	55	11739	822	332	15	5726	213	119	8
20 millones/ml	963	110	12637	1064	214	34	4956	563	276	51
40 millones/ml	602	82	4432	733	98	11	2140	197	927	45

5 Tabla 5 ilustra la variedad de factores de crecimiento diferentes secretados de queratinocitos y fibroblastos contenidos en una matriz de fibrina. También se conoce en la técnica que bFGF producido por estas células se pueden encontrar en la matriz de fibrina. Se observó que los niveles absolutos de factores de crecimiento eran dependientes de la naturaleza particular del factor de crecimiento en cuestión. Debido a la potencia biológica y semivida depende de la molécula, los niveles pg reales de factores de crecimiento independientes no es el interés primario. En su lugar, se cree que la acción biológica del cóctel de moléculas secretadas de estas células conjuntamente ofrece una única forma de dirección de muchas rutas biológicas de manera simultánea. Merece la pena indicar que las cantidades fisiológicas de los factores de crecimiento y citoquinas se están produciendo.

10 En la Tabla 5, la secreción de las 5 moléculas diferentes parece ser dependiente de la dosis de acuerdo con la concentración de células empleadas. Esto mantiene la verdad de como la concentración de células se incrementa de 2,5 a 10 millones de células/ml. Para la mayoría de los factores, excepto KGF y HGF, incluso se observan mayores niveles de secreción a 20 millones de células/ml. Sin embargo, una vez que el número se incrementa a 40 millones de células/ml, se observa una caída en la producción de proteínas para todas las moléculas excepto IL-1 beta.

15 Esto sugiere que una concentración óptima de células existe probablemente, y que, como se muestra, cada concentración de células conducirá a la producción de un perfil de proteína diferente como se observa en la Tabla 6 más abajo. Tabla 6 se generó mediante la normalización de la secreción de VEGF, KGF, HGF e IL-1 beta a la de GM-CSF. Esto ilustra que, para diferentes concentraciones de células, existe un perfil de proteína diferente, produciéndose moléculas a diferentes relaciones dependiendo de la concentración de células en consideración.

20

**TABLA 6**

	<b>GM-CSF</b>	<b>VEGF</b>	<b>KGF</b>	<b>HGF</b>	<b>IL-1 beta</b>
2,5 millones/ml	1	111,3	10	207,6	3,2
5 millones/ml	1	84	4,9	84,1	1,4
10 millones/ml	1	31,5	0,9	15,3	0,3
20 millones/ml	1	13,1	0,2	5,1	0,3
40 millones/ml	1	7,4	0,2	3,6	1,5

**Ejemplo 6: Ensayo clínico C2001 de fase I Allox**

Descripción del producto

25 El tratamiento a base de células alogénicas (llamado Allox) bajo investigación es un producto de dos componentes que se puede aplicar por vía tópica a úlceras crónicas usando un aplicador de pulverización. Tras la pulverización de los dos componentes en el sitio de herida, se crea una matriz de fibrina que atrapa células aplicadas en la región de la úlcera, permitiendo la liberación local de factores tróficos por estas células

Los contenidos de los 2 componentes eran:

Componente nº 1 Una suspensión líquida de fibrinógeno; (1 pulverización = 50 µl)

30 Componente nº 2 Una suspensión líquida de queratinocitos y fibroblastos (relación 1:1, 15 x 10<sup>6</sup> células/ml) mezclada con trombina; (1 pulverización = 50 µl)

Objetivo

35 El objetivo de este estudio era determinar los efectos Allox en la cicatrización de heridas de úlceras crónicas, determinar su seguridad y tolerabilidad en una población de pacientes, y determinar el efecto del producto en la incidencia de cierre completo de la herida de úlceras de pierna crónicas en pacientes con insuficiencia venosa o arteriovenosa.

Metodología

40 Se reclutaron pacientes por encima de 18 años de edad con al menos una úlcera venosa o arteriovenosa combinada entre el tobillo y la rodilla que cumplía los criterios de elegibilidad del protocolo para recibir Allox en el estudio C2001. En el día de estudio (SD) -14, pacientes se encontraron elegibles y reclutados para recibir el tratamiento Allox. En SD1, los pacientes recibieron la primera aplicación del tratamiento de estudio, que se repitió en base semanal hasta 8 semanas, o hasta que cierra la úlcera, lo que sucedió primero. Se realizó una visita de

seguimiento 4 después de la última aplicación del tratamiento.

Número de Pacientes

Un total de 13 pacientes se enrolaron inicialmente, uno de los cuales se determinó que no era elegible para el protocolo más tarde.

5 Diagnóstico y Criterios principales para Inclusión

Pacientes por encima de 18 años de edad con una o más úlcera venosa o arteriovenosa combinada entre el tobillo y la rodilla cuya etiología se confirmó por Índice de Presión Braquial de Tobillo, por presión de tobillo y / o dedo gordo del pie, y por ultrasonido dúplex eran elegibles para este estudio. En SD-14 los pacientes tenían que tener una úlcera de más de 1 mes de duración con un área de superficie mayor que 1 cm<sup>2</sup>. A los pacientes se les requirió que fueran capaces de comunicarse y cooperar con el Investigador y otro personal y tenía que proporcionar consentimiento escrito informado. Los pacientes femeninos tenían que ser posmenopáusicas o haber sido esterilizadas quirúrgicamente.

10

Tratamiento de ensayo y Modo de Administración

La aplicación por pulverización secuencial de las soluciones se proporcionó en el kit de dos botellas. Se aplicó un total de 0,4 ml de producto de manera alternativa: 2 pulverizaciones de componente nº 1 (fibrinógeno) seguido de 2 pulverizaciones de componente nº 2 (células + trombina). Este procedimiento se repitió dos veces. Tal aplicación cubre 12 cm<sup>2</sup> de área de úlcera, y cada cm<sup>2</sup> de herida tratado recibió un total de 0,25x10<sup>6</sup> células.

15

Duración del Tratamiento

En SD1, los pacientes recibieron la primera aplicación, que se repitió en base semanal hasta 8 semanas, o hasta que cierra la úlcera, lo que sucedió primero. Se realizó una visita de seguimiento 4 después de la última aplicación del tratamiento. La duración del período de estudio fue de 14 semanas, que constaba de un período de 2 semanas de rodaje, un tratamiento de 8 semanas tratamiento y un período de seguimiento de 4 semanas.

20

Criterios de Evaluación

Se determinó la eficacia anotando el cierre completo de la úlcera; superficie del área de la úlcera en la semana 8 y semana 12 comparado con SD1; efecto borde; y síntomas de úlcera.

25

Se controló la seguridad siguiendo la frecuencia y gravedad de episodios adversos hasta la semana 12. También se reseñaron los ensayos de laboratorio estándar, exámenes físicos y mediciones de signo vital

Procedimientos estadísticos

Dado el pequeño número de pacientes tratados, no se realizó ningún análisis estadístico. En su lugar, los resultados se presentan en el presente documento en forma descriptiva.

30

Resultados

**TABLA 7: REDUCCIÓN DE LA SUPERFICIE DE ÚLCERA EN PACIENTES INDIVIDUALES TRATADOS CON ALLOX**

ID. Del Paciente	Centro	Área de superficie de úlcera (cm <sup>2</sup> ) en SD1	Área de superficie de úlcera (cm <sup>2</sup> ) en SD7	Área de superficie de úlcera (cm <sup>2</sup> ) a las 4 semanas de seguimiento	% de reducción de área SD1 - SD57	% de reducción de área SD1 - seguimiento
200111	1	50,4	52,0	55,2	-3	-10
200113	1	14,0	15,4	12,5	-10	10
200114	1	44,0	50,9	62,8	-16	-43
200124	2	21,5	20,4	19,9	5	7
200125	2	11,8	10,2	9,8	14	16
200126	2	7,7	16,2	16,2	-110	-110

(continuación)

ID. Del Paciente	Centro	Área de superficie de úlcera (cm <sup>2</sup> ) en SD1	Área de superficie de úlcera (cm <sup>2</sup> ) en SD7	Área de superficie de úlcera (cm <sup>2</sup> ) a las 4 semanas de seguimiento	% de reducción de área SD1 - SD57	% de reducción de área SD1 - seguimiento
200127	2	10,6	6,5	5,8	38	45
200129	2	64,5	72,6	73,5	-13	-14
200141	4	10,3	5,5	0,5	47	95
200142	4	20,0	14,0	10,3	30	48
200143	4	0,8	0,0	0,0	100	100
200144	4	1,8	0,1	0,0	92	100

Se observó un cierre total en la úlcera en SD57 y para dos úlceras en la semana 4 de seguimiento. Para 5 pacientes, se observó una mejora definida como más de 30% de disminución en el área de la superficie. Fracaso en el tratamiento, que se definió o bien como no reducción en tamaño de úlcera o un incremento de tamaño de úlcera durante el período de estudio, se observó en 4 pacientes tratados con Allox.

#### Conclusiones de estudio clínico

Semanalmente los tratamientos con Allox durante un período de 8 semanas se determinó que era seguro y no tóxico para los pacientes con úlceras de pierna crónicas. Las dos infecciones de úlcera que estaban potencialmente relacionadas con el tratamiento se resolvieron antes del final del estudio. Las infecciones de úlcera suaves eran relativamente comunes si no se respetaba la higiene correcta en el sitio.

Cinco pacientes mostraron más de 30% de reducción de área al final del período de seguimiento, mostrando 2 pacientes cierre completo de la úlcera. A partir de este pequeño estudio, se observó una respuesta en úlceras "más jóvenes" (< 6 meses).

#### Ejemplo 7: Diluciones óptimas de ensayo de Tisseel VH (cola de Fibrina) y Plasma Humano estándar

Fibrina es un polímero biológico potencial que se puede emplear para suspender y atrapar mezclas de células para propósitos terapéuticos. La fibrina polimerizada se crea mezclando fibrinógeno y trombina conjuntamente a concentraciones apropiadas. En la matriz mostrada en la FIG 3, se ensayaron diversas diluciones de fibrinógeno (Tisseel, Baxter) y trombina (Tisseel, Baxter) para determinar su efecto sobre el procedimiento y generación de la polimerización del producto fibrina final. Las diluciones se consideraba que variaban entre 1/4 y 1/80 de los componentes de fibrinógeno y trombina originales eran suministradas en el kit TissuCol. En el kit Tisseel original, fibrinógeno tenía una concentración de 75 a 115 mg/ml, mientras que la trombina tenía una concentración de 500 IU/ml. Para este estudio, el fibrinógeno se diluyó en HBSS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> y la trombina se diluyó en HBSS con Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>.

Las características de fibrina se consideraban incluidas en el tiempo de polimerización (segundos), consistencia, y resistencia mecánica. El polímero de fibrina se generó usando una técnica de pulverización mediante la que una pulverización de fibrina se combinó con una pulverización de trombina en un único pocillo de una placa de cultivo de 24 pocillos. Se repitieron las condiciones por triplicado. El volumen de pulverización empleado fue de 130 µl por pulverización.

Todas las diluciones se consideraban que permitían la formación de un polímero de fibrina, aunque las propiedades del polímero de fibrina varió ampliamente dependiendo de las diluciones empleadas. La consistencia y Resistencia mecánica de la fibrina se valoraron usando la escala (-, +, ++, +++) en la que - se consideró escasa y +++ se consideró excelente. Las valoraciones de ++ o +++ se consideraron que eran aceptables para el uso potencial para suspender las células para aplicaciones terapéuticas. Las condiciones de la dilución máxima de fibrinógeno eran 1/20 fibrinógeno y 1/8 trombina, mientras que condiciones de la dilución máxima de trombina eran 1/4 fibrinógeno y 1/40 trombina.

De manera adicional, el plasma normal también se puede usar como un material de matriz para la producción de una cola biológica para atrapar células en el sitio de aplicación de una herida. Las mezclas hechas pipeteando plasma humano no diluido normal conjuntamente con trombina a una dilución de 1/50 permitieron la formación de un coágulo o polímero de fibrina. El polímero de fibrina mostró características de manipulación similares a las colas de fibrina comercialmente disponibles, sugiriendo que puede servir como un sustituto a productos concentrados

basados en fibrina de Baxter Tisseel VH o Tissucol y Haemacure APR.

**Ejemplo 8: Comparación de la liberación del Factor de crecimiento de Células pulverizadas contra no pulverizadas.**

5 FIG. 4 muestra la secreción de factores de crecimiento desde las células atrapadas en una matriz de fibrina, de acuerdo con los procedimientos de la presente invención. La secreción de VEGF y GM-CSF se determina a partir del medio acondicionado 24 horas durante el segundo día después de la producción de la matriz de células de fibrina. La secreción de bFGF se midió en los extractos obtenidos de la matriz celular 48 horas después de la producción. A las células detenidas en crecimiento, Tanto los fibroblastos como queratinocitos humanos primarios se trataron con 8 ug/ml de mitomicina durante cinco horas. Se enjuagaron las células con HBSS sin  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  antes de la tripsinaización.

Se aplicaron las células usando una bomba de pulverización distribuyendo 50  $\mu$ l por pulverización.

Relación de Queratinocitos: Fibroblastos = 1:4

2 pulverizaciones ( $1,5 \times 10^6$  células): 100  $\mu$ l de componente (15 millones de células/ml) (células + trombina) + 100  $\mu$ l de componente fibrinógeno.

15 4 pulverizaciones ( $3 \times 10^6$  células): 200  $\mu$ l de componente (15 millones células/ml) (células + trombina) + 200  $\mu$ l de componente fibrinógeno.

Sin pulverización ( $1,5 \times 10^6$  células): 100  $\mu$ l de componente (15 millones células/ml) (células + trombina) + 100  $\mu$ l componente fibrinógeno.

Relación de Queratinocitos: Fibroblastos = 1:1.

20 No pulverizadas (pipeteadas) ( $2 \times 10^6$  células): 250  $\mu$ l de componente (8 millones células/ml) (células + trombina) + 250  $\mu$ l de componente fibrinógeno.

FIG. 4 compara la cantidad de factores de crecimiento secretados producida por las preparaciones de fibrina después de la pulverización de dosis de células en pocillos individuales de una placa de cultivo de 24 pocillos. La figura también muestra las cantidades de secreción de factor de crecimiento cuando las preparaciones de células y fibrina se preparan mediante un pipeteado simple (no pulverizadas). Una comparación de preparaciones pulverizadas y no pulverizadas indica que existe una disminución en la secreción medida de VEGF, mientras los niveles de secreción de GM-CSF y bFGF son comparables. De manera adicional, un incremento entre 2 a 4 pulverizaciones conduce a mayores niveles de secreción de factores de crecimiento por las células, que resalta la posibilidad de dosificación de factores de crecimiento por alteración del número de células. Los GM-CSF y VEGF secretados se dosificaron en el medio de cultivo, mientras bFGF se dosificó en la matriz de fibrina. Los datos se presentan como promedio + SEM (n = 4, pulverización; n = 3, sin pulverización).

**Ejemplo 9: Comparación de producción de Factor de crecimiento por diferentes relaciones de células de Queratinocitos:Fibroblastos**

35 En la FIG. 5a y FIG. 5b, se realiza una comparación de factores de crecimiento liberados de las células atrapadas en una matriz de fibrina. La matriz de células de fibrina se forma por pulverización o bien una o dos pulverizaciones de componente n° 2 (células + trombina) con una o dos pulverizaciones de componente n° 1 (fibrinógeno). Se empleó una concentración de  $15 \times 10^6$  células/ml en el componente n° 2 y la bomba de pulverización usada distribuyó un volumen de 70  $\mu$ l por pulverización. Para las células detenidas en crecimiento, tanto fibroblastos como queratinocitos humanos primarios se trataron con 8 ug/ml de mitomicina durante 5 horas. Las células se enjuagaron con HBSS sin  $Ca^{2+}$  ni  $Mg^{2+}$  antes de la tripsinaización.

En la FIG. 5a, una pulverización ( $1,05 \times 10^6$  células) = 1 pulverización de células + trombina (70  $\mu$ l) y 1 pulverización de fibrinógeno (70  $\mu$ l). In FIG. 7b, dos pulverizaciones ( $2,1 \times 10^6$  células) = 2 pulverización de células + trombina (140  $\mu$ l) y 2 pulverizaciones de fibrinógeno (140  $\mu$ l).

45 FIGS. 5a y 5b demuestran que la mezcla de queratinocitos y fibroblastos a diferentes relaciones, aunque mantiene un número de células constante, da lugar a unas características de secreción de factor de crecimiento variables. A medida que se añaden los queratinocitos a los fibroblastos, se observa un aumento en la secreción de GM-CSF. Para una pulverización, a relaciones de queratinocitos:fibroblastos de 1: 24 a 1:8 se alcanza una meseta para la producción de GM-CSF. La adición adicional de queratinocitos al segundo componente de la preparación de células de la invención no parece proporcionar una ventaja en términos de secreción de GM-CSF.

50 Considerando dos preparaciones de pulverización, a una relación de queratinocitos:fibroblastos de 1:49 a 1:1 la secreción de GM-CSF pasa a 5000 pg/día. Mientras que la secreción de GM-CSF es mayor a una relación de

queratinocitos:fibroblastos de 1:4, es evidente que se gana la mayor secreción de GM-CSF cuando se pasa de una relación de 1:99 a 1:49.

Además, es evidente que la producción de VEGF depende en gran medida de los queratinocitos a fibroblastos en el componente nº 2. En los experimentos detallados en las FIGS 5a y 5b, parece ser la secreción óptima de VEGF cerca de una relación de queratinocitos:fibroblastos de 1:8, ya que el incremento adicional el número de queratinocitos conduce a una disminución en la cantidad de VEGF secretada.

A diferentes relaciones de de células, la aplicación de un gran número de pulverizaciones también conduce a un incremento en los niveles de secreción de factor de crecimiento. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM (n = 4, pulverización; n = 3, 2 pulverizaciones).

#### 10 **Ejemplo 10: Comparación of Almacenamiento a -160°C c ontra -80°C durante una semana**

La FIG. 7 muestra una comparación de secreción de factor de crecimiento por las células almacenadas crioconservadas a -160°C contra a -80°C durante un período de una semana. El crioprotector usado en este experimento era usa solución de glicerol al 10% con trombina al 10% (Tisseel, Baxter) y la relación de queratinocitos:fibroblastos empleada era 1:1. Antes de crioconservación, se desprendieron las células de sus superficies de cultivo usando tripsina y posteriormente se irradiaron con radiación gamma ( $\gamma$ ) a 80Gy. Se usó un congelador de velocidad controlada para enfriar gradualmente las preparaciones de células hasta - 80°C . Después de descongelar una semana más tarde, una pulverización (130  $\mu$ l) de la preparación de células (1,3 millones de células a 10 millones de células/ml) se mezclaron por pulverización con una pulverización (130  $\mu$ l) de fibrinógeno en pocillos individuales de una placa de 24 pocillos. Los resultados muestran la secreción de GM-CSF, VEGF, y bFGF durante el día 2 para tres muestras almacenadas durante una semana a -160°C y cuatro muestras almacenadas durante una semana a -80°C comparadas con una muestra ra reciente control (no congelada) que contiene el mismo crioprotector. GM-CSF y VEGF secretados se dosificaron en el medio de cultivo, mientras se dosificó bFGF en la matriz de fibrina. Los datos de secreción indican que tanto -80°C como -160°C son adecuados para almacenamiento, aunque -160°C puede ser preferible cuando se usa solución de glicerol al 10%. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM (n = 4).

#### **Ejemplo 11: Comparación de Secreción después de una semana de Almacenamiento a -80°C en glicerol al contra 15% Glicerol.**

FIG. 8 muestra una comparación de la secreción de GM-CSF, VEGF y bFGF por las células crioconservadas a - 80°C en glicerol al 10% contra en glicerol al 15% durante un período de una semana. La relación de queratinocitos:fibroblastos usada en este ejemplo era 1: 1 mezclada con trombina al 10% (Tisseel, Baxter) y un crioprotector. Antes de crioconservación, células se desprendieron de su superficie de cultivo usando tripsina y posteriormente se irradiaron usando radiación gamma ( $\gamma$ ) a 80 Gy. Se usó un congelador de velocidad controlada para enfriar gradualmente las preparaciones de células hasta -80°C. Después de descongelar una semana más tarde, una pulverización (130  $\mu$ l) de la preparación de células (1.3 millones de células a 10 millones de células/ml) se mezclaron por pulverización con una pulverización (130  $\mu$ l) de fibrinógeno en pocillos individuales de una placa petri de 24 pocillos .

Los resultados muestran la secreción de GM-CSF, VEGF, y bFGF durante el día 2 para cuatro muestras almacenadas durante una semana a -80°C usando glice rol al 10% y cuatro muestras almacenadas durante usa semana a - 80°C usando glicerol al 15% comparadas con muestras recientes control (no congeladas) que contenían las mismas concentraciones de crioprotector. Se observó una tendencia de mayor secreción de proteína en muestras almacenadas en glicerol al 15% contra las mantenidas en glicerol al 10%. GM-CSF y VEGF secretados se dosificaron en un medió de cultivo mientras bFGF se dosificó en la matriz de fibrina. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM (n = 4).

#### 45 **Ejemplo 12: Comparación de secreción después de una semana de Almacenamiento a -80°C en al 15% contra Glicerol al 15% + HSA al 5%**

La FIG. 9 muestra una comparación de secreción de factor de crecimiento por células crioconservadas a -80°C en glicerol al 15% contra glicerol al 15% + albúmina sérica humana (HSA) al 5% (Griffols) durante un período de una semana. La relación de queratinocitos:fibroblastos usada en este ejemplo se mezcló 1:3 con trombina al 10% (Tisseel, Baxter) y un crioprotector. Antes de crioconservación, células de desprendieron de sus superficies de cultivo usando tripsina y posteriormente se irradiaron usando radiación gamma ( $\gamma$ ) a 80Gy. Se usó un congelador de velocidad controlada para enfriar gradualmente las preparaciones de células hasta -80°C. Después de de scongelar una semana más tarde, una pulverización (130  $\mu$ l) de la preparación de células (1,3 millones de células a 10 millones de células/ml) se mezclaron por pulverización con una pulverización (130  $\mu$ l) de fibrinógeno en pocillos individuales de una placa petri. Los resultados muestran la secreción de GM-CSF, VEGF, y bFGF secreción durante el día 2 para tres muestras almacenadas durante una semana a -80°C usando glicerol al 15% y tres muestr ras

almacenadas durante una semana a -80°C usando glicero al 15% + HSA al 5% (Griffols) comparadas con muestras recientes control (no congeladas) que contenían los mismos crioprotectores. Los datos de secreción indican que la adición de Albúmina sérica humana mejora la formulación de producto congelado permitiendo mayores niveles de secreción de proteína. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM (n = 4).

5 **Ejemplo 13: Bioactividad de mezclas de Queratinocitos y Fibroblastos después de almacenamiento a largo plazo de Almacenamiento a -80°C**

La FIG. 10 detalla la secreción de proteínas GM-CSF y VEGF por preparaciones de células después almacenamiento a una temperatura de -80°C durante largos períodos de tiempo. Se muestran los datos de tres lotes de producción clínica separados. Los lotes que contenían una relación de fibroblastos a queratinocitos primarios humanos de 1:1 a una concentración final de  $10 \times 10^6$  células/ml se irradiaron usando radiación gamma ( $\gamma$ ) a 80 Gy y se congelaron en solución que contenía trombina, glicerol al 15% y albúmina sérica humana (HSA) al 5%. Las muestras de cada lote de producción se descongelaron después de 1, 4, 8, y 12 semanas de almacenamiento a -80°C. Las muestras descongeladas se pulverizaron posteriormente en placas de 24 pocillos para ensayo. En pocillos individuales, se mezcla una única pulverización (130  $\mu$ l) de células+trombina+crioprotector con una única pulverización (130  $\mu$ l) de fibrinógeno. La mezcla de estas dos pulverizaciones crea una matriz de polímero de fibrina que contiene fibroblastos y queratinocitos vivos. La secreción de proteínas por células atrapadas en la matriz de fibrina se mide durante el día 2 (durando el período de 24 horas a 48 horas después de descongelar).

Secreción de GM-CSF y VEGF en el medio mediante descongelación de preparaciones de células permanece relativamente estable durante un período de almacenamiento que dura 3 meses a -80°C. Ligeras variaciones en secreción de GM-CSF se observó de lote en lote individual, aunque la secreción dentro de un lote pareció ser relativamente estable. El VEGF secretado pareció estable, en promedio, tanto desde una perspectiva de lote a lote así como dentro de los lotes de producción individuales. Estos datos revelan que, con respecto a la secreción de GM-CSF y VEGF, el producto es estable en un estado criogénico a -80°C durante períodos que duran al menos 12 semanas. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM.

25 **Ejemplo 14: Comparación de Secreción después de una semana de Almacenamiento a -80°C para diferentes relaciones de Queratinocitos:Fibroblastos**

La FIG. 11 muestra la secreción de factores de crecimiento de formulaciones de preparación de células crioconservadas después de una semana de almacenamiento a -80°C. El gráfico muestra diferencias en la secreción de diversas relaciones de queratinocitos:fibroblastos primarios humanos, incluyendo 1:0, 1:1, y 1:9 así como diferencias asociadas a concentraciones de células totales 5, 10 y 20 millones de células/ml. Antes de crioconservación, las células se desprendieron de su superficie de cultivo usando tripsina y posteriormente se irradiaron usando radiación gamma ( $\gamma$ ) a 80 Gy. Se usó un congelador de velocidad controlada para enfriar gradualmente las preparaciones de células hasta -80°C. Después de descongelar una semana más tarde, una pulverización (130  $\mu$ l) de la preparación de células (5, 10 y 20 millones de células/ml) se mezclaron por pulverización con una pulverización (130  $\mu$ l) de fibrinógeno en pocillos individuales de una placa petri de 24 pocillos.

Una comparación de los datos de secreción para la relación 1:0 ratio y la relación 1:1 mostró la importancia de la adición de fibroblastos a los queratinocitos en términos de producción de GM-CSF y VEGF. En todos los casos, existía una relación dependiente de la dosis con la secreción de los factores de crecimiento durante el segundo día después de la descongelación. Los datos también demostraron que la reducción del número de queratinocitos (es decir, mediante la reducción de la relación de queratinocitos:fibroblastos a 1:9) no condujo a una reducción en la secreción global de factores de crecimiento. Estos resultados estaban de acuerdo con los datos obtenidos para preparaciones de células "recientes" no congeladas (véase Ejemplo 9, supra) y sugirió que solamente cantidades mínimas de queratinocitos eran necesarias para producir el efecto sinérgico logrado mediante la mezcla de queratinocitos y fibroblastos conjuntamente. Este estudio también demostró que los fibroblastos juegan un papel importante en la producción de VEGF por las preparaciones de células.

45 **Ejemplo 15: Comparación de Secreción de factor de crecimiento en muestras recientes y Crioconservadas almacenadas a -80°C**

Antes de crioconservación, células se desprendieron de su superficie de cultivo usando tripsina y posteriormente se irradiaron usando radiación gamma ( $\gamma$ ) a 80 Gy. Las concentraciones de ensayadas incluyeron 5, 10, y 20 millones de células/ml (con una relación de queratinocitos:fibroblastos 1:1), cada una mezclada con trombina al 10% (Tisseel, Baxter) y el crioprotector. Se usó un congelador de velocidad controlada para enfriar gradualmente las preparaciones de células hasta -80°C. Después de descongelar una semana más tarde, una pulverización (130  $\mu$ l) de la preparación de células (5, 10 y 20 millones de células/ml) se mezclaron por pulverización con una pulverización (130  $\mu$ l) de fibrinógeno en pocillos individuales de una placa petri de 24 pocillos. Para determinar la variabilidad en muestras congeladas (crioconservadas), 3 tubos separados para cada condición se crioconservaron durante una semana a -80°C. Tras la descongelación, se prepararon cinco muestras por tubo. Los datos

presentados en la Tabla 8 es la media de las 15 muestras disponibles para cada condición. Los datos de secreción reproducibles observados en los tres tubos congelados y descongelados por condición atestiguan la calidad del procedimiento de crioconservación. Para las preparaciones recientes, se prepararon o bien 3 ó 4 muestras. Secreción de GM-CSF y VEGF por tanto las preparaciones de células recién tripsinizadas y congeladas se observó que aumentaba a medida que aumentaba la densidad en la matriz de fibrina de 2,5 a 5 a 10 millones de células/ml (correspondiente a 5, 10 y 20 millones de células/ml encontradas en las preparaciones congeladas originales). Esto además ilustra el potencial de dosificación de los efectos terapéuticos por los tratamientos basados en células.

Tabla 8

Nombre de muestra	Nº de muestra	GM-CSF (pg)			VEGF (pg)		
		Promedio	SEM	% reciente	Promedio	SEM	% reciente
5 millones/ml, reciente	4	40	14	100	1433	289	100
10 millones/ml, reciente	4	270	128	100	3418	1293	100
20 millones/ml, reciente	3	751	16	100	5628	1150	100
5 millones/ml, 1 semana a -80°C	15	81	11	202,5	986	96	68,8
10 millones/ml, 1 semana a -80°C	15	254	21	94,1	2135	254	62,5
20 millones/ml, 1 semana a -80°C	15	554	51	73,8	3462	335	61,5

#### 10 Ejemplo 16: Evaluación de la seguridad de Preparación de células congeladas de la invención

La seguridad de la preparación de células de cicatrización de herida de la invención se ha evaluado en un estudio de fase I multicentro, abierto. La preparación de células constaba de un kit que contenía dos componentes. El componente nº 1 era una suspensión de fibrinógeno y el componente nº 2 era una suspensión de queratinocitos y fibroblastos mezclados en trombina y crioprotector. Las preparaciones de células se congelaron a -80°C, se transportaron al lugar de la clínica a -80°C y se almacenaron a -80°C en el lugar hasta uso. Inmediatamente antes de uso, la preparación de células se descongeló en un baño de agua caliente. Después de descongelar los dos componentes (fibrinógeno) y (cell+trombina+crioprotectores) se aplicaron por pulverización secuencialmente en el sitio de herida, formando una matriz de fibrina fina que contenía queratinocitos fibroblastos vivos. Catorce pacientes con úlceras de pierna venosas crónicas no respondían a tratamiento estándar con apósitos y compresión durante al menos 4 semanas (desarrollados en fase) se enrolaron en 5 centros en las Antillas Holandesas y alemanas. Los tamaños de úlcera en el comienzo variaban entre 0,3 y 20,4 cm<sup>2</sup> (media 5,8). Concomitante con el tratamiento estándar, la preparación de células se aplicó después una vez a la semana durante hasta 12 semanas o hasta el cierre completo, lo que antes se produjera primero.

No se reseñó episodios adversos graves en relación con esta preparación de células. Cuatro episodios moderados a graves adversos se creyó que eran atribuibles a la preparación de células (3 x dolor de úlcera, 1x con incremento de tamaño de úlcera). Además, no existía ningún signo clínico de infección de herida. El cierre completo en la semana 12 se observó en 10 pacientes, 7 dentro de 4 semanas y 3 dentro de 4 a 12 semanas de tratamiento. El tiempo medio para cerrar fue de 5,4 semanas.

En conclusión, la preparación de células de la invención es segura y bien protegida para el tratamiento de úlceras de pierna venosas crónicas.

#### Ejemplo 17: Pulverización aplicada a Queratinocitos y Fibroblastos vivos en forma de un Apósito de herida biológicamente activo

Fibroblastos y queratinocitos primarios que residían en la piel, secretan naturalmente un cóctel de factores de

5 crecimiento y citoquinas que actúan para estimular la respuesta de cicatrización de heridas después de la rotura de la barrera cutánea. Para imitar este proceso natural, se desarrolló un apósito de herida a base de células vivas para el tratamiento de úlceras venosas crónicas. Consiste en dos componentes: 1) una solución de fibrinógeno; y 2) a suspensión de queratinocitos y fibroblastos en trombina y crioprotector. El producto se almacena congelado a -80°C hasta uso, momento en el que se descongeló, con los dos componentes aplicados secuencialmente a la superficie de la herida usando un aplicador de pulverización. De esta manera, la polimerización de la fibrina se produce sobre la herida llegando a estar las células administradas atrapadas en una capa fina de fibrina en el sitio de la úlcera.

10 Mezclas de queratinocitos y fibroblastos alogénicos, primarios detenidos en crecimiento se observó que secretan diferentes niveles de proteínas terapéuticas (VEGF, HGF, GM-CSF, bFGF, y KGF) dependiendo de las relaciones empleadas. Secreción de GM-CSF era dependiente de la sinergia derivada de la presencia mutua de fibroblastos y queratinocitos. El incremento de la concentración de células en el apósito de la herida final de  $1,25 \times 10^6$  células/ml a  $5 \times 10^6$  células/ml condujo a una secreción elevada de factores de crecimiento y citoquinas. Estudios preliminares has mostrado que las preparaciones de células permanecen biológicamente activas durante al menos 2 meses cuando se almacenaban a -80°C.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición de regeneración tisular que comprende:
  - (a) un primer componente que comprende fibrinógeno, en el que el primer componente está en la forma de una pulverización; y
  - 5 (b) un segundo componente que comprende trombina y células alogénicas inactivadas mitóticamente, en el que el segundo componente está en la forma de una pulverización y en el que las células comprenden uno o más queratinocitos y fibroblastos que secretan una o más moléculas biológicamente activas seleccionadas entre el grupo que consiste en GM-CSF, VEGF, KGF, bFGF, TGFβ, angiopoyetina, EGF, IL-1β, IL-6, IL-8, TGFα, y TNFα.
- 10 2. La composición de regeneración tisular de la reivindicación 1, en la que uno o más queratinocitos y fibroblastos son fibroblastos y queratinocitos diferenciados.
3. La composición de regeneración tisular de la reivindicación 1, en la que uno o más queratinocitos y fibroblastos están mitóticamente inactivados por administración de mitomicina C u otros inhibidores mitóticos a base de química, irradiación con Rayos-γ, irradiación con Rayos-X, o irradiación con luz UV.
- 15 4. La composición de regeneración tisular de la reivindicación 1, en la que el primer componente además comprende colágeno, alginato, plasma de sangre, o quitosán.
5. La composición de regeneración tisular de la reivindicación 1, en la que el segundo componente además comprende un crioprotector.
- 20 6. La composición de regeneración tisular de la reivindicación 5, en la que el crioprotector se selecciona entre el grupo que consiste en una solución al 15% de glicerol, y una solución al 15% de glicerol y albúmina sérica humana al 5%.
7. La composición de regeneración tisular de la reivindicación 5, en la que el crioprotector es glicerol.
8. Un kit que comprende la composición de regeneración tisular de las reivindicaciones 1 a 7.
- 25 9. El kit de la reivindicación 8, en el que el primer componente y el segundo componente están crioconservados antes del transporte y posteriormente se descongelan antes de uso.
10. El kit de la reivindicación 9, en el que el primero y segundo componentes están cada uno de ellos contenidos en un vial separado que tiene un tapón roscado que se puede separar, en el que el vial es estéril y está fabricado de material resistente a bajas temperaturas y en el que la tapa que se puede separar se puede reemplazar con una bomba de pulverización después de la descongelación del primero y segundo componentes antes de uso.
- 30 11. El kit de la reivindicación 10, en el que la bomba de pulverización distribuye un volumen de aproximadamente 130 μl por pulverización.
12. El kit de la reivindicación 10, en el que el material resistente a bajas temperaturas se selecciona entre el grupo que consiste en vidrio, polipropileno, polietileno, y vinil acetato de etileno (EVA).
- 35 13. El kit de la reivindicación 10, en el que los viales se sellan con una bolsa o recipiente antes de la crioconservación, en el que la bolsa o recipiente está fabricada de un material capaz de soportar temperaturas que varían entre -80° y -196°C y en el que la bolsa o recipiente protege el primero y segundo componentes de contaminación durante la crioconservación y posterior descongelación.
14. El kit de la reivindicación 13, en el que la bolsa o recipiente es estanco al agua y tiene un alto comportamiento de barrera.
- 40 15. La composición de regeneración tisular de la reivindicación 1, en el que el segundo componente comprende entre aproximadamente  $1 \times 10^3$  células/μl y aproximadamente  $50 \times 10^3$  células/μl de las células alogénicas mitóticamente inactivadas.
16. La composición de regeneración tisular de la reivindicación 3, en la que uno o más queratinocitos y fibroblastos están mitóticamente inactivados por mitomicina C.
- 45 17. La composición de regeneración tisular de la reivindicación 3, en la que uno o más queratinocitos y fibroblastos están mitóticamente inactivados por radiación con Rayos-γ.
18. La composición de regeneración tisular de la reivindicación 3, en la que uno o más queratinocitos y fibroblastos

are mitóticamente inactivados por radiación con Rayos-X.

**19.** La composición de regeneración tisular de la reivindicación 3, en la que uno o más queratinocitos y fibroblastos are mitóticamente inactivados por radiación con luz UV.

5 **20.** La composición de regeneración tisular de la reivindicación 5, en la que el crioprotector es un glicerol al 15% y solución de albúmina sérica humana al 5%.

**21.** La composición de regeneración tisular de las reivindicaciones 1-7 y 15-20 para su uso en la regeneración de tejido, en la que la composición de regeneración tisular es para administrar por vía tópica a un sitio de herida en un paciente en necesidad de tratamiento.

10 **22.** La composición de regeneración tisular para su uso de acuerdo con la reivindicación 21, en la que dicho primero y segundo componentes son para administración tópica al sitio de la herida en el paciente.

**23.** La composición de regeneración tisular para su uso de acuerdo con reivindicación 21, en la que el primero y segundo componentes son para combinar en el sitio de herida.

**24.** La composición de regeneración tisular para su uso de acuerdo con reivindicación 21, en la que dicho primero y segundo componentes son para combinar en el aire antes de alcanzar el sitio de la herida.

15 **25.** La composición de regeneración tisular para su uso de acuerdo con reivindicación 22, en la que dicho primer componente es para aplicar al sitio de la herida antes de que dicho segundo componente sea aplicado al sitio de la herida.

ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR BrdU DE FIBROBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS DESPUÉS DE 15 Y 30 DÍAS EN CULTIVO DESPUÉS DE TRATAMIENTOS DE RADIACIÓN GAMMA

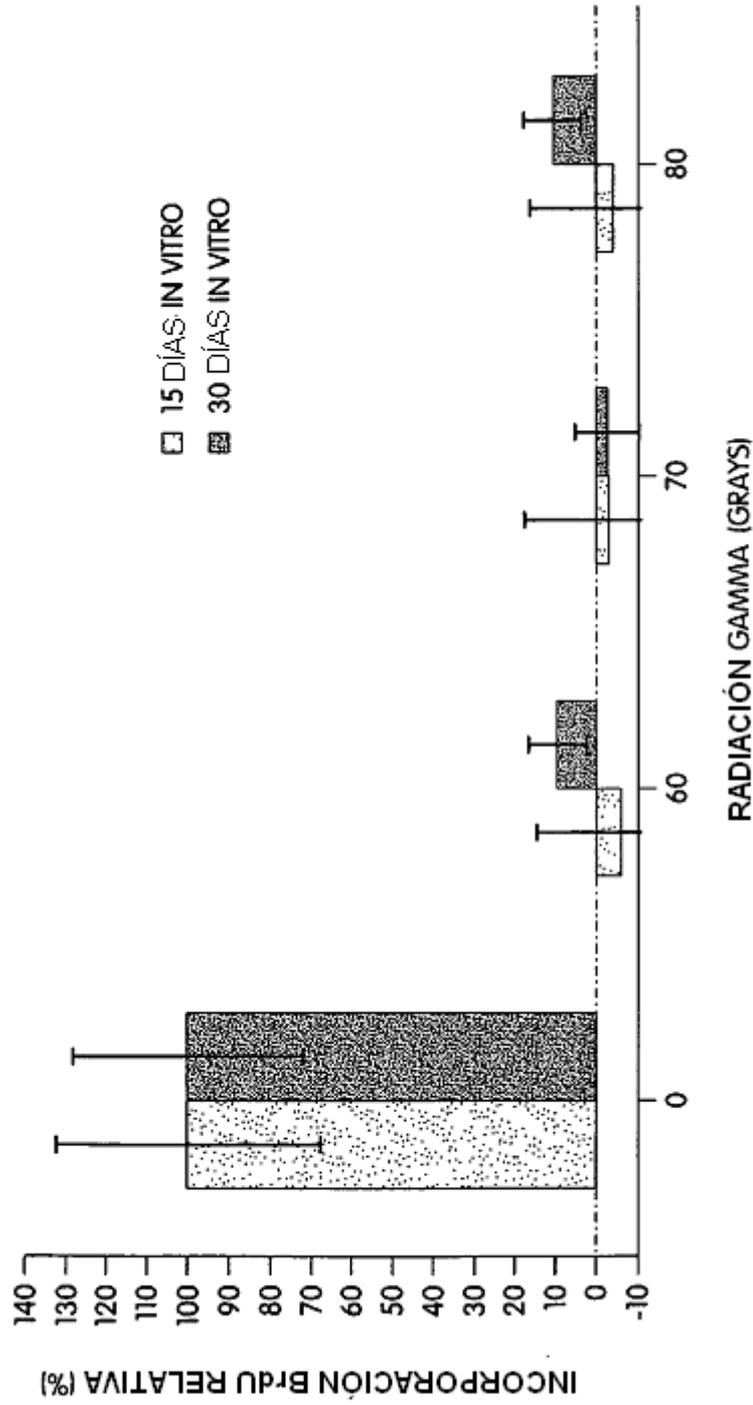


Fig. 1

ADHERENCIA DE FIBROBLASTOS PRIMARIOS HUMANOS A UNA PLACA PETRI  
DESPUÉS DE TRATAMIENTOS DE RADIACIÓN GAMMA (MEDIDA POR ROJO NEUTRO)

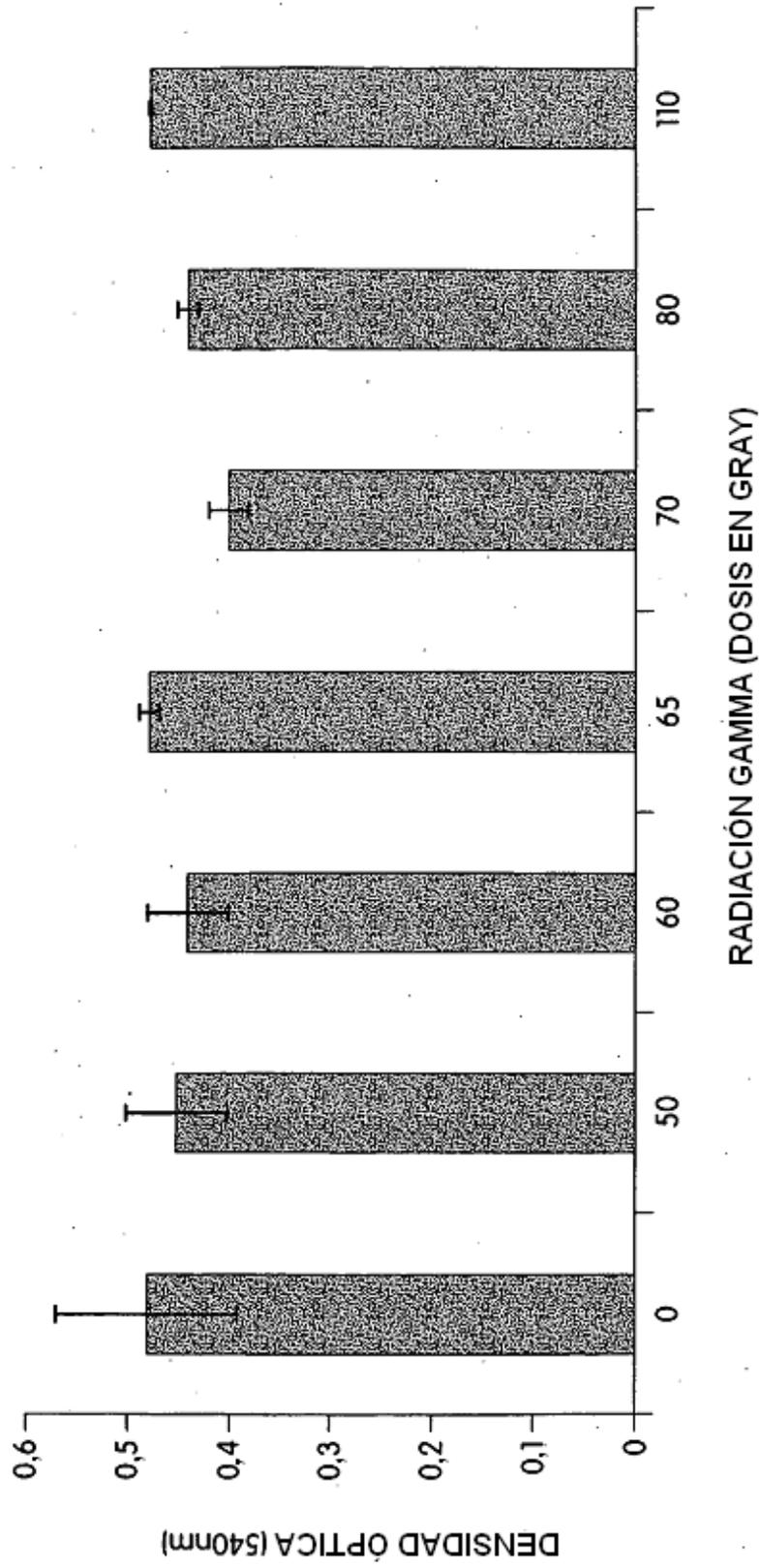


Fig. 2

	TROMBINA 1/4			TROMBINA 1/8			TROMBINA 1/10			TROMBINA 1/20			TROMBINA 1/40			TROMBINA 1/80		
FIBRINÓGENO 1/4	2	+++	+++	2	+++	+++	2	+++	+++	4	++	++	10	++	++	15	++	+
FIBRINÓGENO 1/8	2	+++	+++	3	+++	+++	5	++	++	5	++	++	15	+	+	20	++	-
FIBRINÓGENO 1/10	2	++	++	3	++	++	5	++	++	5	++	++	15	+	+	20	+	-
FIBRINÓGENO 1/20	5	++	++	5	++	++	5	++	+	5	+	+	15	+	+	20	+	-
FIBRINÓGENO 1/40	10	++	+	20	++	+	20	+	+	20	-	-	20	-	-	30	-	-
FIBRINÓGENO 1/80	30	+	-	30	+	-	30	-	-	30	-	-	30	-	-	30	-	-
			RESISTENCIA			RESISTENCIA			RESISTENCIA			RESISTENCIA			RESISTENCIA			RESISTENCIA
			CONSISTENCIA			CONSISTENCIA			CONSISTENCIA			CONSISTENCIA			CONSISTENCIA			CONSISTENCIA
			TIEMPO DE POLIMERIZACIÓN (SEG)			TIEMPO DE POLIMERIZACIÓN (SEG)			TIEMPO DE POLIMERIZACIÓN (SEG)			TIEMPO DE POLIMERIZACIÓN (SEG)			TIEMPO DE POLIMERIZACIÓN (SEG)			TIEMPO DE POLIMERIZACIÓN (SEG)

Fig. 3

(COMPARACIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO LIBERADO DE CÉLULAS PULVERIZADAS CONTRA NO PULVERIZADAS)

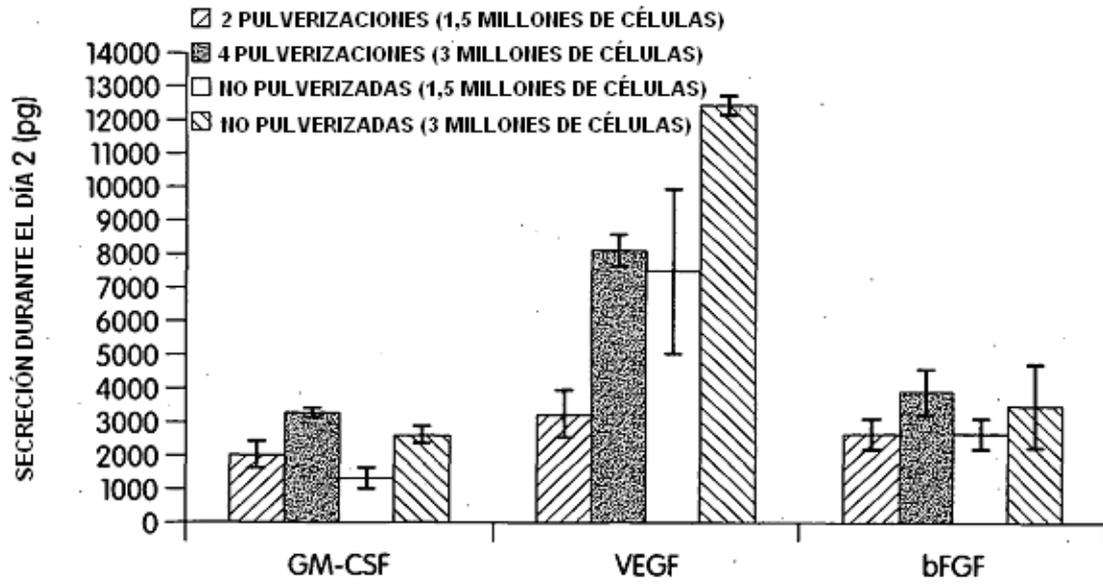


Fig. 4

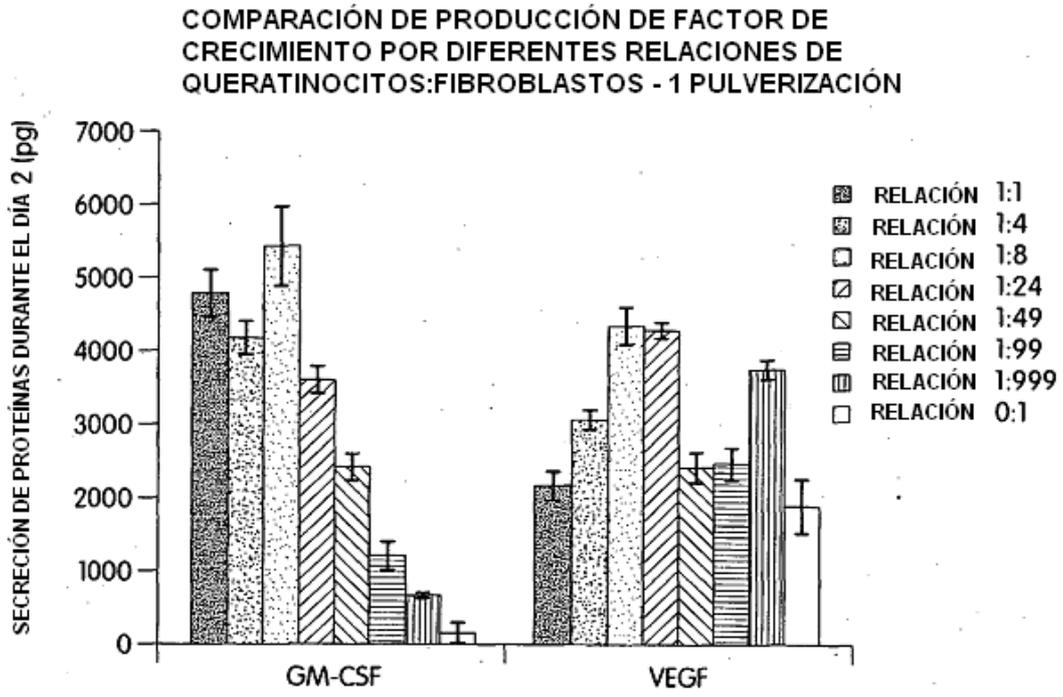


Fig. 5A

COMPARACIÓN DE PRODUCCIÓN DE FACTOR DE  
 CRECIMIENTO POR DIFERENTES RELACIONES DE  
 QUERATINOCITOS:FIBROBLASTOS - 2 PULVERIZACIONES

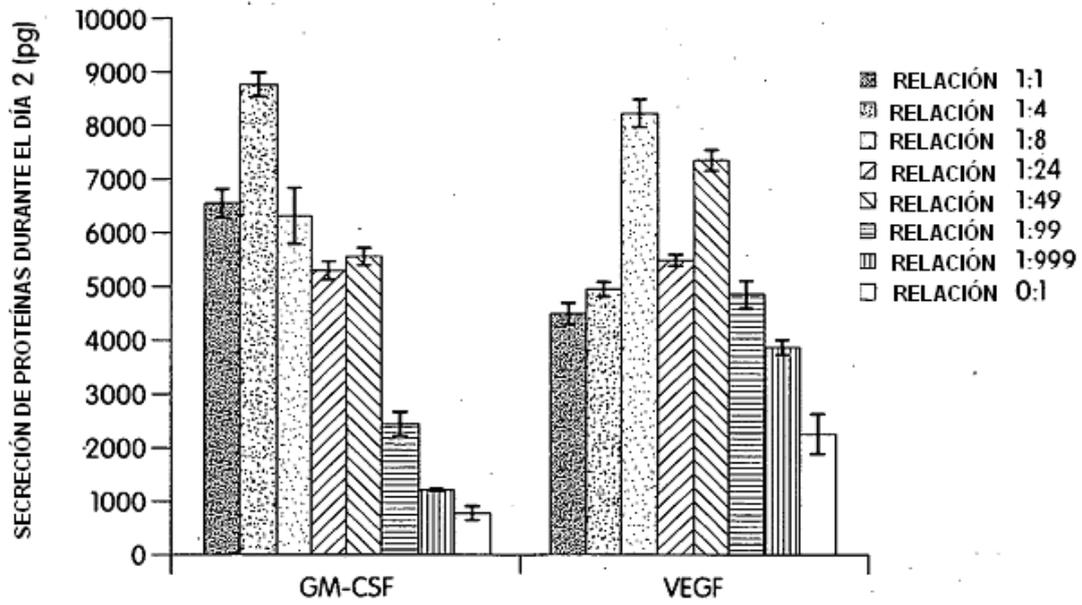


Fig. 5B

Rosca 1UK

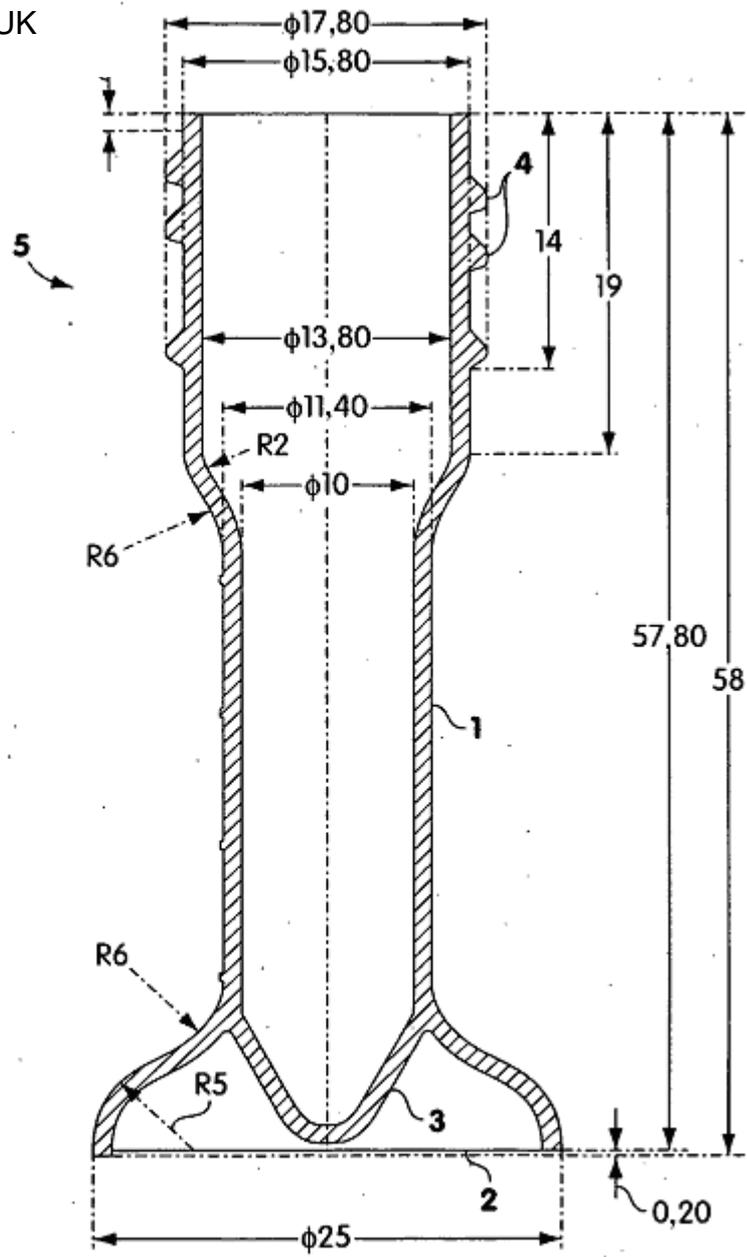


Fig. 6A

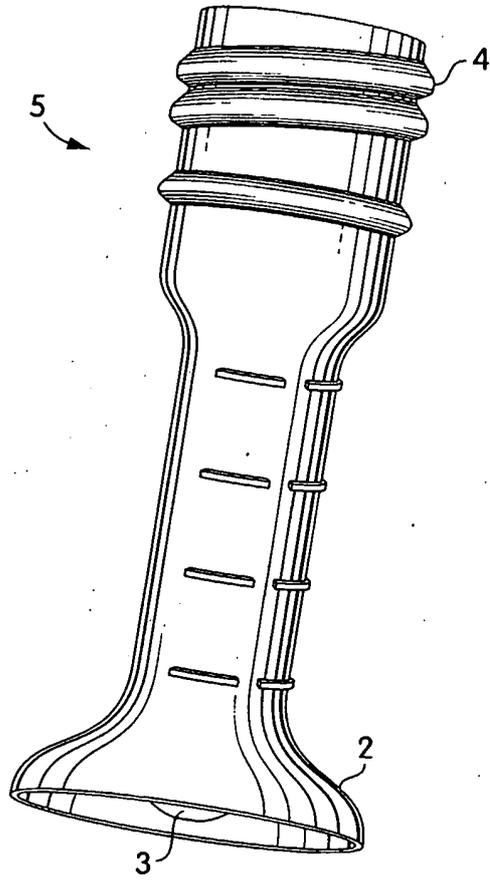


Fig. 6B

COMPARACIÓN DE ALMACENAMIENTO A -160°C CONTRA -80°C DURANTE 1 SEMANA GLICEROL AL 10% - RELACION DE QUERATINOCITOS:FIBROBLASTOS (1:1), 10 MILLONES DE CÉLULAS/ml, 1 PULVERIZACIÓN (130 ul), 24 POCILLOS

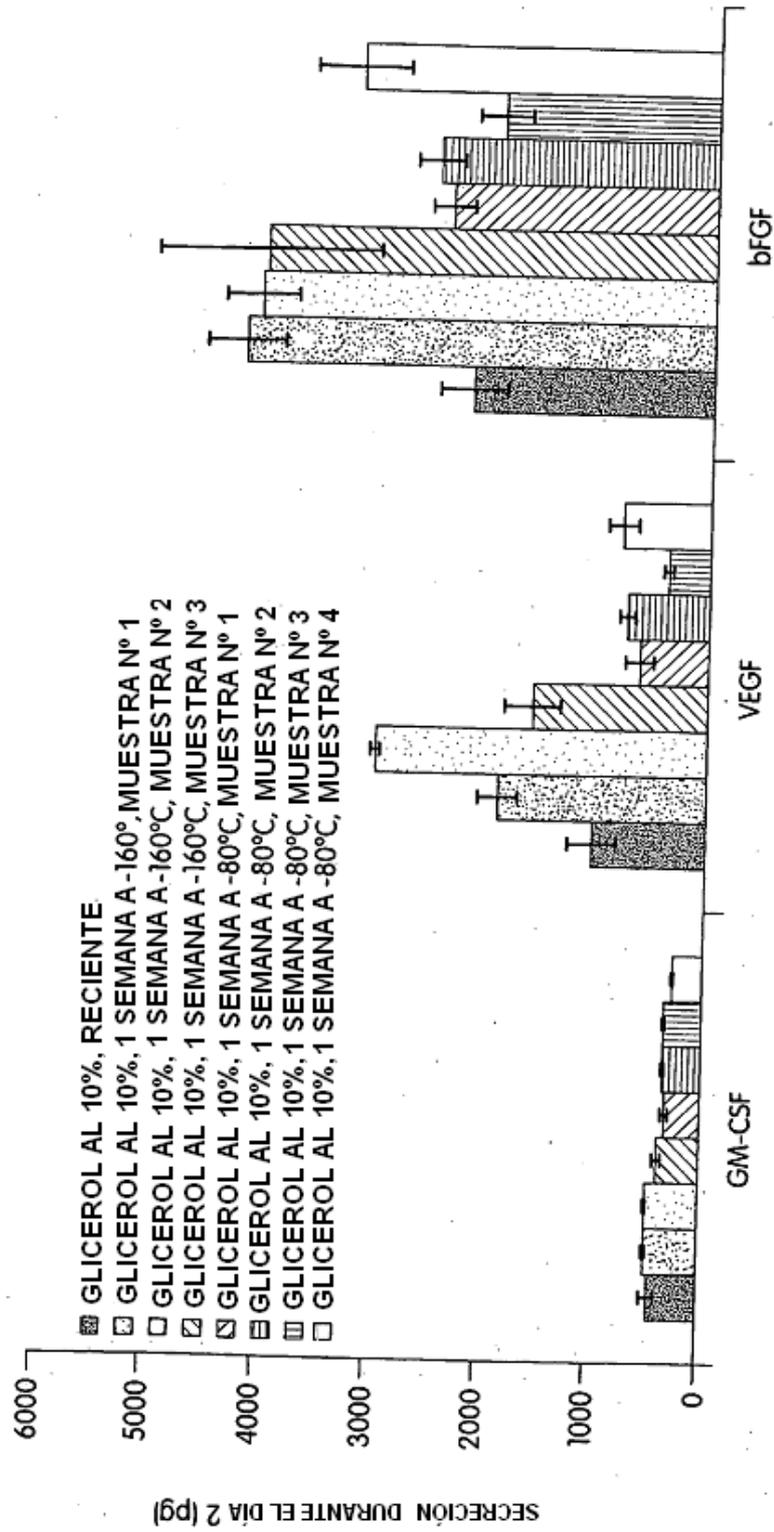


Fig. 7

COMPARACIÓN DE LA SECRECIÓN DESPUÉS DE UNA SEMANA DE ALMACENAMIENTO A -80°C GLICEROL AL 10% CONTRA GLICEROL AL 15%; 10 MILLONES DE CÉLULAS/ml RELACIÓN DE QUERATINOCITOS:FIBROBLASTOS (1:1), 1 PULVERIZACIÓN (130 ul)

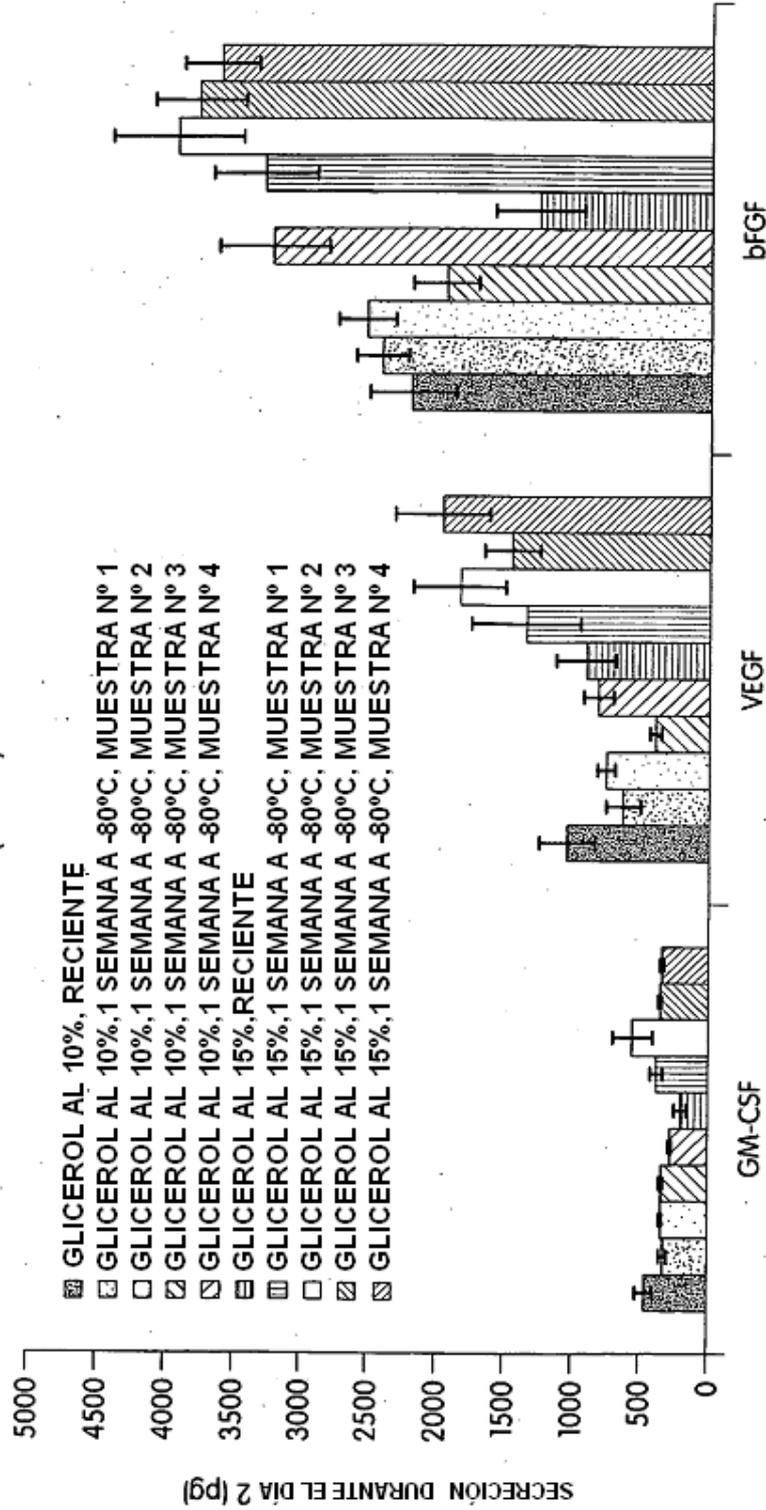
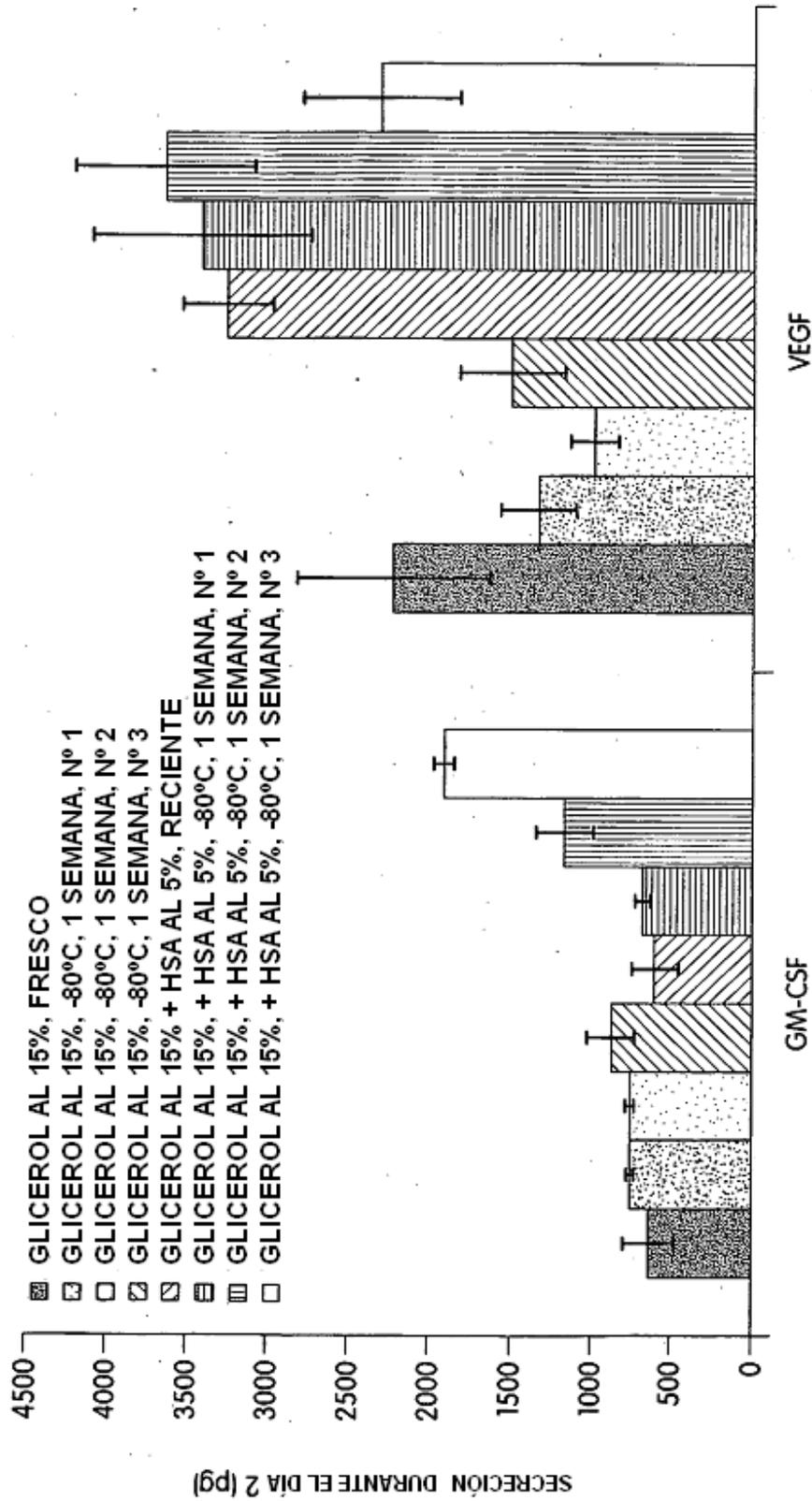


Fig. 8

**CRIOCONSERVACIÓN Y 1 SEMANA DE ALMACENAMIENTO DE PREPARACIONES DE CÉLULAS A -80°C  
GLICEROL AL 15% CONTRA GLICEROL AL 15% + HSA AL 5% (GRIFFOLS)  
10 MILLONES DE CÉLULAS/ml, RELACIÓN Q:F (1:3) 130 ul, 1 PULVERIZACIÓN**



**Fig. 9**

EFFECTO DE ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO A -80°C  
 SOBRE LA SECRECIÓN DE FACTOR DE CRECIMIENTO DE QUERATINOCITOS Y  
 FIBROBLASTOS EN UNA MATRIZ DE FIBRINA

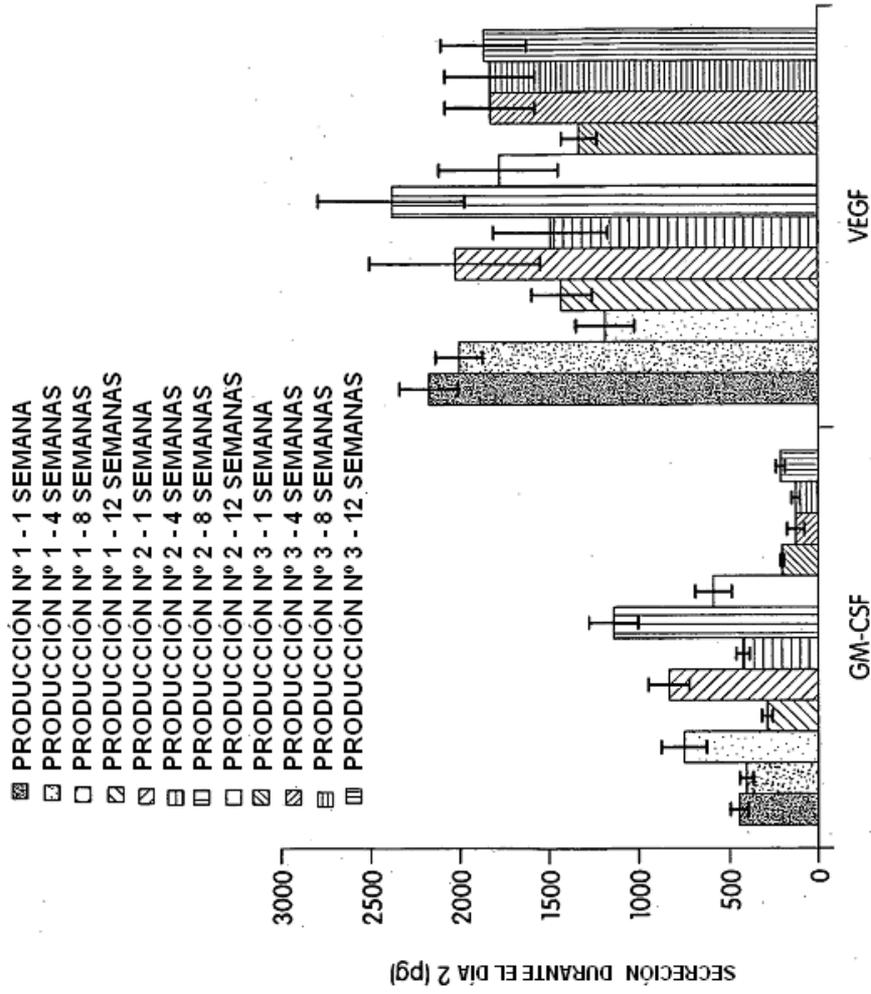


Fig. 10

SECRECIÓN POR PREPARACIONES DE CÉLULAS DESCONGELADAS QUE SE CONGELARON Y ALMACENARON DURANTE 1 SEMANA A -80°C; RELACIONES DE QUERATINOCITOS:FIBROBLASTOS (1:0, 1:1, Y 1:9) A 5, 10 Y 20 MILLONES DE CÉLULAS/ml, 1 PULVERIZACIÓN (130 ul), 24 POCILLOS (n = 15)

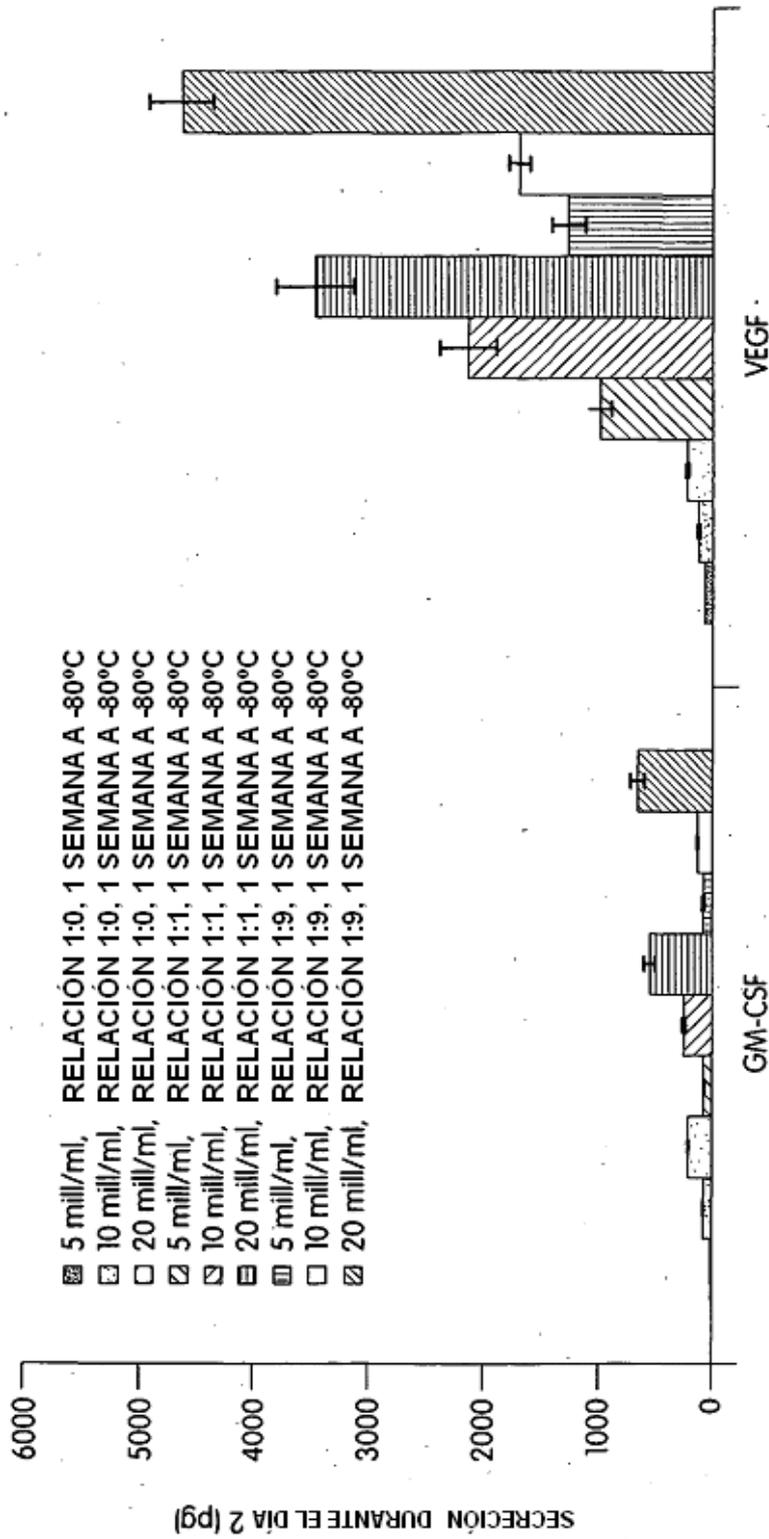


Fig. 11