

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 678**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06009091 .7**
96 Fecha de presentación: **20.07.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1702979**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.09.2006**

54 Título: **Cultivo mejorado de queratinocitos y su uso**

30 Prioridad:
20.07.1999 US 358181
10.04.2000 US 546269

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.10.2012

73 Titular/es:
DFB Technology Holdings, LLC
318 McCullough
San Antonio, TX 78215 , US

72 Inventor/es:
Hunziker, Thomas y
Limat, Alain

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 388 678 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

Cultivo mejorado de queratinocitos y su uso

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo del cultivo celular de células fibroblásticas dérmicas y precursoras de queratinocitos humanos. La invención también se refiere al uso de células precursoras de queratinocitos cultivadas en la reparación de defectos de la piel mediante procedimientos de injerto dérmico.

Antecedentes de la invención

10 La cicatrización de los defectos dérmicos progresa a través de tres fases generales: (i) inflamación, (ii) migración de las células de la herida y mitosis y (iii) producción de matriz extracelular y remodelación. Se cree que la secuencia ordenada de estos sucesos está orquestada por interacciones entre células, factores de crecimiento, y proteínas de la matriz extracelular. Una etapa crucial de la cicatrización de las heridas de la piel es la regeneración epidérmica (es decir, la re-epitelialización). Además, los queratinocitos epidérmicos interfoliculares de los bordes de la herida, las células de la vaina externa de la raíz (ORS) de los folículos pilosos residuales también contribuyen a este proceso (véase, por ejemplo, Eisen y col., 15 J. Invest. Dermatol. 145-155 (1955). La ORS de los folículos pilosos se compone en su mayor parte de queratinocitos no diferenciados que abarcan las estructuras cilíndricas de la vaina interior endurecida de la raíz y el eje piloso (véase, por ejemplo, Montagna y Parakkal, en: The Structure and Function of Skin 172-258 (Academic Press Nueva York, NY, 1974)). Bibliografía reciente también ha indicado que las células ORS se encuentran a un nivel de compromiso más inferior para la diferenciación que los queratinocitos interfoliculares basales (véase, por ejemplo, Coulombe y col., 109 J. Cell Biol. 2295-2312 (1989); Limat y col., 194 Exp. Cell Res. 218-227 (1991); Limat y col., 275 Cell Tissue Res. 169-176 (1994)), habiéndose detectado en los animales, así como en la región de la ORS humana, cerca del área sobresaliente, células que conservan el marcaje, que representan posiblemente células madre para los tejidos epiteliales dérmicos (véase, por ejemplo, Cotsarelis y col., 61 Cell 1329-1337 (1990); Kobayashi y col., 90 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 7391-7395 (1993); Yang y col., 105 J. Invest. Dermatol. 14-21 (1993); Rochat y col., 76 Cell 1073-1076 (1994); Moll, 105 J. Invest. Dermatol. 14-21 (1995). Adicionalmente, las células ORS humanas que se aíslan de los folículos pilosos depilados del cuero cabelludo anagénico pueden desarrollarse ampliamente *in vitro* (véase, por ejemplo, Weterings y col., 104 Brit. J. Dermatol. 1-5 (1981); Limat & Noser, 87 J. Invest. Dermatol. 485-488 (1986); Imcke y col., 17 J. Am. Acad. Dermatol. 779-786 (1987); Limat y col., 92 J. Invest. Dermatol. 758-762 (1989). En condiciones de cultivo de inmersión convencionales, las células ORS se asemejan a los queratinocitos epidérmicos interfoliculares tanto por criterios morfológicos como bioquímicos (por ejemplo, perfiles queratínicos (véase, por ejemplo, Stark y col., 35 Differentiation 236-248 (1987); Limat y col., 92 J. Invest. Dermatol. 758-762 (1989); Limat y col., 642 Ann. NY Acad. Sci. 125-147 (1991). En cultivos organotípicos con fibroblastos dérmicos humanos (esto es, en condiciones que imitan el entorno epidérmico), las células ORS desarrollan, con respecto a criterios histológicos, inmunohistológicos, ultraestructurales y bioquímicos, un epitelio estratificado que recuerda a la epidermis regeneradora (véase, por ejemplo, Lenoir y col., 130-Dev. Biol. 610-620 (1988); Limat y col., 194 Exp. Cell Res. 218-227 (1991); Limat y col., 642 Ann. N.Y. Acad. Sci. 125-147 (1991). Si dichos cultivos organotípicos se injertan en ratones desnudos, las células ORS forman una neo-epidermis regular que está bajo control homeostático (véase, por ejemplo, Limat y col., 59 Transplantation 1032-1038 (1995). Por tanto, las células ORS humanas poseen un interés considerable en aplicaciones clínicas.

40 En la década anterior, el interés se ha centrado en la utilización de células epiteliales cultivadas para cubrir heridas. En primer lugar, láminas de queratinocitos interfoliculares autólogos cultivados se injertaron con éxito sobre heridas agudas, principalmente en el tratamiento de quemaduras más grandes de tercer grado (véase, por ejemplo, O'Connor y col., 1 Lancet 75-78 (1981); Compton y col., 60 Lab. Invest. 600-612 (1989), aunque también en el tratamiento de epidermólisis ampollosa (véase, por ejemplo, Carter y col., 17 J. Am. Acad. Dermatol. 246-250 (1987), piodermitis gangrenosa (véase, por ejemplo, Dean y col., 26 Ann. Plast. Surg. 194-195 (1991); Limova y Mauro, 20 J. Dermatol. Oncol. 833-836 (1994)), y de las heridas después de la extirpación de lunares congénitos gigantes (véase, por ejemplo, Gallico y col., 84 J. Plast. Reconstr. Surg. 1-9 (1989) o la separación de gemelos siameses (véase, por ejemplo, Higgins y col., 87 J. Royal Soc. Med. 108-109 (1994)).

50 Al contrario que en el tratamiento de dichas heridas agudas, el injerto de heridas crónicas (por ejemplo, úlceras de las piernas) con queratinocitos cultivados, ha sido mucho menos exitoso. Los aloinjertos no dan como resultado un "prendido" permanente (véase, por ejemplo, Fabre, 29 Immunol. Lett. 161-166 (1991) y de este modo, pueden clasificarse como un "apósito biológico muy eficaz aunque costoso" (véase, Phillips y col., 21 J. Am. Acad. Dermatol. 191-199 (1989). Un "prendido" definitivo, importante, reproducible, de queratinocitos autólogos injertados mediante diversas modalidades incluyen: láminas de cultivos queratinocíticos sumergidos que consisten sólo en algunas capas de células no cornificadas (Hetton y col., 14 J. Am. Acad. Dermatol., 399-405 (1986); Leigh y Purkis, 11 Clin. Exp. Dermatol. 650-652 (1986); Leigh y col., 117 Brit. J. Dermatol. 591-597 (1987); Harris y col., 18 Clin. Exp. Dermatol. 417-420 (1993), células únicas tripsinizadas unidas a apósitos revestidos con colágeno (Brysk y col., 25 J. Am. Acad. Dermatol. 238-244 (1991), o equivalentes dérmicos (Mol y col., 24 J. Am. Acad. Dermatol. 77-82 (1991), aún tienen que documentarse de modo convincente en la bibliografía científica. La misma ausencia de hallazgos cuantitativos se mantiene también para diversos informes respecto al injerto de queratinocitos interfoliculares autólogos, recién aislados (Hunyadi y col., 14 J. Dermatol. Surg. Oncol. 75-78 (1988)) o células ORS (Moll y col., 46

Hautarzt 548-552 (1995) fijados al lecho de la herida utilizando un adhesivo de fibrina. Sin embargo, debe observarse que las desventajas del suero bovino utilizado durante el cultivo de los queratinocitos puede contribuir a una tasa reducida de "prendido", debido al hecho de que esto opone resistencia en los queratinocitos (véase, por ejemplo, Johnson y col., 11 J. Bum Care Rehab. 504-509 (1990)).

5 Para producir equivalentes dérmicos, el documento DE-A-19651992 describe el cultivo de células de la vaina exterior de la raíz en suero homólogo o autólogo al 10-15%. Para optimizar la manipulación, los equivalentes dérmicos pueden sembrarse en membranas de ácido hialurónico o en otro material biodegradable antes del trasplante.

10 Lenoir-Viale, M.C. (Arch. Dermatol. Res. 1993-285: páginas 197-204) describe la preparación *in vitro* de una epidermis reconstruida a partir de la vaina externa de la raíz de folículos pilosos humanos. La epidermis reconstruida se describe como una herramienta valiosa y prometedora para estudios farmacológicos y puede representar un modelo de cicatrización de las heridas.

15 Limat A, (J. of Investigative Dermatology 2000, 7 de nov, páginas 128-134) describe el cultivo de folículos pilosos (los bulbos pilosos y las partes infundibulares se eliminan) para generar equivalentes epidérmicos y su utilización para tratar las úlceras crónicas de las piernas.

Limat y Hunziker, Meth. In Mol. Med.: Human Cell Culture Protocols, Totowa, NJ, 1996, páginas 21-31 desvelan un procedimiento que comprende las etapas de depilar folículos pilosos del cuero cabelludo, disociar células ORS del folículo y después colocar las células ORS disociadas en un medio de soporte de crecimiento sobre una capa alimentadora preformada.

20 **Sumario de la invención**

Antes de la descripción de la presente invención en el presente documento, la metodología convencional para la generación de un cultivo primario de queratinocitos de ORS consiste en depilar cabello anagénico (es decir, eje piloso en crecimiento) mediante una disección microscópica cuidadosa para eliminar los bulbos pilosos y el eje piloso infundibular. La vaina externa de la raíz resultante se colocó después sobre el inserto de cultivo para iniciar el cultivo de queratinocitos primario. Sin embargo, numerosos estudios posteriores (aproximadamente 200), en los que el cabello anagénico se colocó directamente en el inserto de cultivo, sin realizar la microdisección inicial para eliminar los bulbos pilosos y el eje piloso infundibular, han demostrado que no se requiere tal disección tediosa y que requiere tiempo de depilar cabello anagénico. Esto ha servido para simplificar notablemente el proceso de manipulación, reducir el riesgo de contaminación y dar como resultado un inicio más eficaz de la siembra en placa de las células queratinocíticas.

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es proporcionar procedimientos simplificados y mejorados para generar queratinocitos o precursores queratinocíticos a partir de células de la vaina externa de la raíz (células ORS) en condiciones de cultivo completamente definidas para el tratamiento de diversos tipos de defectos dérmicos (por ejemplo, heridas crónicas tales como úlceras de las piernas, úlceras diabéticas, llagas por presión, y similares), tanto en seres humanos como en animales. Además de su uso en el tratamiento de heridas, los queratinocitos también pueden utilizarse en la cirugía plástica y cosmética, o allí donde exista una demanda de dicho soporte dérmico (por ejemplo, postoperatorios después de la eliminación de tatuajes, lunares, cáncer dérmico, papilomas, después de amputaciones, en la transformación sexual o recuperación de la virginidad, rejuvenecimiento de piel actínicamente dañada después de su reparación, timpanoplastia, epitelialización del canal externo del oído y similares).

Estos objetivos anteriormente mencionados se consiguen por explantación y cultivo de cabello depilado, anagénico o en crecimiento, en su totalidad sobre membranas microporosas que llevan células alimentadoras fibroblásticas humanas en su superficie inferior. En dichos cultivos primarios, pueden obtenerse, de manera fácil y repetida, grandes cantidades de células ORS, independientemente de la edad cronológica del donante. Dichas células ORS pueden utilizarse para la preparación posterior del complejo dérmico, es decir, equivalentes epidérmicos o dermo-epidérmicos, o mantenerse congelados y guardados para utilizarlos en un momento posterior.

La preparación posterior de equivalentes dérmicos o epidérmicos puede conseguirse "sembrando" estas células ORS sobre una membrana microporosa, modificada, que lleva, en su superficie inferior, células alimentadoras fibroblásticas (mas preferentemente "células alimentadoras" fibroblásticas dérmicas humanas de crecimiento detenido/limitado). Durante el cultivo, estas células ORS experimentan diferenciación tisular que se ha demostrado que es similar a la de la epidermis normal. Este hallazgo se debe muy probablemente a un amplio compartimiento de células proliferantes. Las condiciones de cultivo modificadas que se divulgan en el presente documento son importantes para el éxito del tratamiento de heridas crónicas con equivalentes epidérmicos generados *in vitro* a partir de células ORS autólogas.

55 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar sistemas de cultivo mejorados para queratinocitos derivados de ORS por adhesión de cabello anagénico sobre una membrana microporosa polimérica revestida con una o más moléculas de origen matricial extracelular. Estos cultivos de células ORS mejorados, diseñados como equivalentes dérmicos o equivalentes epidérmicos pueden usarse para tratar defectos en la piel, especialmente

heridas crónicas.

Otro objeto adicional de la presente invención es producir equivalentes dérmicos o epidérmicos usando una concentración reducida de suero alogénico u homólogo. Esto mitiga enormemente el riesgo de transmisión de enfermedades, por ejemplo, por el uso clínico de productos sanguíneos, por el uso de suero humano autólogo u homólogo y sustancias derivadas o liberadas de componentes sanguíneos (por ejemplo plaquetas sanguíneas) para complementos en etapas de cultivo *in vitro*.

Un objeto adicional de la presente invención es una metodología que reduce la probabilidad de lesión mecánica (por ejemplo, separación de las diversas capas constituyentes) de los equivalentes dérmicos y epidérmicos durante el transporte antes de trasplante.

Las ventajas clínicas de la metodología de la presente invención, en comparación con las técnicas de injerto de heridas crónicas que se han utilizado previamente, incluyen, pero sin limitación: la no invasividad (por lo que las células están disponibles de manera repetida), la no necesidad de instalaciones quirúrgicas o anestesia durante el procedimiento del injerto y un corto periodo requerido de solo 2 horas inmovilización después del procedimiento del injerto.

15 **Descripción detallada de la invención**

Si no se define en contra, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados a los entendidos habitualmente por cualquiera de los expertos en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque en la realización práctica de la presente invención puede usarse cualquier procedimiento y material que sea similar o equivalente a los descritos en el presente documento, ahora se describen los procedimientos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan en este por referencia en su totalidad.

La expresión "capa queratinocítica", como se usa en el presente documento significa un cultivo tisular queratinocítico generado *in vitro* con una estructura más o menos diferenciada. La expresión "equivalente epidérmico", en el presente documento significa un cultivo tisular organotípico generado *in vitro* que se parece en su estructura histológica a la epidermis natural, especialmente respecto a la estratificación y desarrollo de la capa córnea. Una epidermis estratificada normal está formada por una capa basal de células cuboides pequeñas, varias capas espinosas de células progresivamente aplanadas, una capa granular prominente y una capa córnea ortoqueratótica. Todas estas capas pueden detectarse en los equivalentes epidérmicos que son objeto de la invención. La localización de los productos de diferenciación epidérmica que se han ensayado mediante inmunohistoquímica (por ejemplo, queratinas, involucrina, filagrina, integrinas) es similar a la encontrada en la epidermis normal.

El término "autólogo", como se usa en el presente documento, significa: (i) que el material biológico que va a trasplantarse deriva del individuo que va a tratarse con los equivalentes epidérmicos; o (ii) que el material biológico que se añade a los cultivos titulares proviene del donante de las células para el cultivo tisular.

El término "homólogo", como se usa en el presente documento, significa: (i) que el material biológico que va a trasplantarse deriva de uno o más individuos de la misma especie que el individuo que va a tratarse con los equivalentes epidérmicos; o (ii) que el material biológico que se añade a los cultivos titulares proviene de uno o más individuos de la misma especie que el donante de las células para el cultivo tisular.

La expresión "cultivo organotípico" y similar, se refiere al cultivo de células en condiciones que promueven la diferenciación de las células. En condiciones de cultivo organotípico, la proliferación de las células aminora en comparación con el cultivo en condiciones "proliferativas" tales como las condiciones primarias de cultivo, y puede detenerse completamente. En este caso, una condición importante para el cultivo organotípico es el mantenimiento de las células en la interfase aire-líquido, una condición que se denomina cultivo "elevado".

La expresión "liberado de componentes sanguíneos" (por ejemplo, plaquetas sanguíneas), como se usa en el presente documento, significa cualquier combinación de citoquinas o de otros factores de crecimiento obtenidos de componentes sanguíneos (por ejemplo, plaquetas sanguíneas). Las plaquetas estimuladas, por ejemplo, con trombina, liberan el contenido de sus gránulos alfa en el medio circundante. Los gránulos alfa contienen habitualmente diversas citoquinas (por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*), los factores alfa y beta transformantes del crecimiento (TGF alfa/beta), el factor 4 plaquetario (PF-4), la proteína básica de las plaquetas (PBP). Sin embargo, es posible obtener citoquinas y otros factores del crecimiento a partir de las plaquetas mediante otros procedimientos que con la trombina estimulante. Además, otros componentes sanguíneos producen también factores de crecimiento y citoquinas. Los monocitos, por ejemplo, producen IL-1, TNF alfa, IL-6 y otras sustancias de interés.

Procedimiento general para preparar equivalentes epidérmicos a partir de células ORS

Las células precursoras queratinocíticas se seleccionan de la vaina externa de la raíz (ORS) de cabello anagénico o en crecimiento derivado del individuo que va a tratarse posteriormente con los equivalentes epidérmicos. En general, se depilan aproximadamente 40 folículos pilosos del cuero cabelludo, y después, con un microscopio de disección,

se seleccionan los que se encuentran en la fase anágena (es decir, un eje piloso en crecimiento). Normalmente se requiere un total de 4 semanas de cultivo para obtener aproximadamente 1 cm² de equivalentes epidérmicos a partir de cinco folículos pilosos. Sin embargo, con técnicas de cultivo y de fermentación mejoradas, puede ser posible obtener un mayor rendimiento (es decir, un área más grande de equivalentes epidérmicos, en este período de tiempo).

El procedimiento convencional previo para la generación de un cultivo primario de queratinocitos ORS consistía en depilar un cabello anagénico (es decir, un eje piloso en crecimiento) seguido de una cuidadosa disección microscópica para eliminar los bulbos pilosos y el eje infundibular piloso. La vaina externa de raíz (ORS) resultante se colocaba después en el inserto del cultivo para iniciar el cultivo primario de queratinocitos. Sin embargo, numerosos estudios posteriores (aproximadamente 200) en los que el cabello anagénico se colocaba directamente en el inserto del cultivo, sin llevar a cabo la microdisección inicial para eliminar los bulbos pilosos y el eje infundibular piloso, han demostrado que no era necesaria tal disección, tediosa y que emplea mucho tiempo, del cabello anagénico depilado. Esto ha servido para simplificar notablemente el proceso de manipulación, reducir el riesgo de contaminación y dar como resultado un inicio más eficaz del sembrado en placa de las células queratinocíticas.

Los cabellos anagénicos seleccionados se incubaron en un tampón de lavado apropiado que contenía diversos agentes antimicrobianos y antifúngicos (por ejemplo, fungizona, penicilina, y estreptomycin). Después de este procedimiento, todo el cabello anagénico depilado se colocó directamente en el inserto del cultivo y se dejó que creciese durante varios días, preferentemente 7-14 días, y más preferentemente entre 8 y 10 días. Una etapa opcional y adicional comprende el paso del cultivo primario y la realización de un cultivo secundario para obtener más material celular para la preparación de áreas más grandes de equivalentes epidérmicos.

El inserto de cultivo, una membrana microporosa revestida con una o más sustancias de la matriz extracelular (por ejemplo, fibrina, fibronectina, colágenos, lamininas o hialuronano o sus mezclas), transporta, en su superficie inferior, un sistema de células alimentadoras de crecimiento detenido/limitado. El revestimiento del inserto de membrana con tales sustancias de la matriz extracelular proporciona: (i) una potenciación de la superficie de cultivo para la adhesión inicial del cabello anagénico (es decir, se pega fácilmente y permanece estacionario); (ii) una superficie que potencia significativamente la migración de los queratinocitos ORS lejos de los folículos pilosos anagénicos de la vaina externa de la raíz (ORS) y (iii) las tasas de crecimiento aumentadas de la propagación de los queratinocitos ORS (es decir, el tiempo de cultivo total que es necesario para la producción de piel completamente diferenciada o de equivalentes epidérmicos) pueden reducirse a 3 semanas, en lugar de 4.

El sistema de células alimentadoras de crecimiento detenido/limitado, mencionado anteriormente, localizado en la superficie inferior de la membrana de inserto microporosa comprende fibroblastos dérmicos primarios obtenidos a partir de una biopsia de piel humana. Los fibroblastos dérmicos primarios se tratan con mitomicina-C durante 4 a 6 horas antes de su utilización como un "capa celular alimentadora" para el cabello anagénico depilado y después se siembran en placa en el lado inferior del inserto de cultivo. La limitación/detención del crecimiento se induce mediante mitomicina-C o por tratamiento con rayos X o, preferentemente, la concentración en suero se reduce por debajo del 5%, y preferentemente por debajo del 2%. Deberá observarse que, aunque algunos cultivos se han realizado utilizando suero fetal de ternero al 10% (FCS; Boehringer Mannheim, Alemania), se ha encontrado que la utilización habitual del suero humano, para reducir el número de ingredientes alogénicos, proporciona un resultado notablemente superior y la proliferación de las células ORS. Además, el suero humano se utiliza preferentemente a una concentración menor del 5%, y más preferentemente a una concentración del 2%. En presencia de tales concentraciones séricas bajas, los fibroblastos dérmicos humanos primarios de la presente invención detendrán el crecimiento completa o significativamente. Por consiguiente, de esta manera, pueden eliminarse dos etapas costosas y posiblemente complicadas en el sistema autólogo de cultivo de ORS. Las dos etapas complicadas incluyen: (i) eliminación de concentraciones séricas altas > 5%, que reducen significativamente el coste total del proceso y; (ii) la eliminación del tratamiento con mitomicina-C, que proporciona un sistema de cultivo completamente libre de mitomicina-C y elimina cualquier preocupación respecto a la eliminación total del fármaco del inserto de cultivo primario, antes del crecimiento de los equivalentes epidérmicos. Además, la utilización de concentraciones séricas reducidas permite que se elimine el procedimiento alternativo de detención de las células alimentadoras (es decir, la etapa de exposición a los rayos x) ahorrando de este modo tiempo y gasto en el procedimiento global.

Después de la expansión de las células ORS a una densidad apropiada (es decir, de 1 x 10³ a 10⁶ células/cm², y preferentemente de 5 x 10⁴ a 1 x 10⁵ células/cm²), estas se utilizan para la preparación de equivalentes epidérmicos. Preferentemente, las células crecen hasta alcanzar la confluencia. Los equivalentes epidérmicos se preparan sembrando células ORS a una densidad celular apropiada (es decir, de 30 x 10³ a 100 x 10³ células/cm², y preferentemente a 60 x 10³ células/cm²) en el interior de un dispositivo de cultivo que sea apropiado para "levantar" las células hasta la interfase aire-líquido durante el cultivo. A continuación, de uno a cuatro días después de la siembra (preferentemente 3 días después de la siembra), las células ORS se exponen al aire (por ejemplo, mediante aspiración del medio en el interior del inserto), continuando después los cultivos durante aproximadamente 10-20 días, y preferentemente durante 14-18 días, en tal condición de cultivo "levantada". El medio se cambia periódicamente durante el cultivo levantado, preferentemente cada dos a tres días.

La presente invención también incluye equivalentes de la piel que incluyen capas adicionales, y por lo tanto, son estructuras más complejas que los equivalentes epidérmicos. Los equivalentes de la piel comprenden células ORS

diferenciadas como su parte epidérmica y también una capa que incluye un componente matricial, preferentemente uno que contiene fibroblastos dérmicos incrustados y/u otras células (es decir, "una matriz incrustante"). Los equivalentes de la piel se preparan poniendo una matriz con una o más sustancias de la matriz extracelular (por ejemplo, fibrina, fibronectina, colágenos, lamininas o hialuronano o sus mezclas) en la superficie superior de la membrana microporosa descrita anteriormente. Cuando los fibroblastos dérmicos humanos se incrustan, preferentemente fibroblastos dérmicos humanos autólogos, las células se incrustan a una densidad de 1×10^3 a 1×10^7 células/cm³; preferentemente de 1×10^4 a 1×10^5 células/cm³; y mas preferentemente a aproximadamente 5×10^4 células/cm³. Después, el cultivo primario de células ORS se siembra en la parte superior de la matriz (que contiene preferentemente fibroblastos dérmicos incrustados y/u otras células), y el cultivo organotípico se realiza tal y como se ha descrito anteriormente. Para una descripción detallada de la preparación de equivalentes dérmicos (véase, por ejemplo, Limat y col., 194 Exp. Cell Res. 218-277 (1991)).

Sin embargo, debe observarse que las células que están incrustadas en la matriz no necesitan limitarse exclusivamente a fibroblastos dérmicos, pues también pueden utilizarse células epidérmicas, mesenquimáticas, neuronales y/o endoteliales. Las células incrustadas que se obtienen preferentemente de tejido de la piel, son más preferentemente células alogénicas y aún más preferentemente son células autólogas.

Todas las etapas del cultivo pueden realizarse en un medio apropiado que permite la proliferación de las células ORS y su producción a partir de los folículos pilosos; el medio se cambia típicamente cada 2 a 3 días. Generalmente, en todas las etapas se utiliza el mismo medio. El medio se basa típicamente en un medio mínimo y contiene diversos ingredientes adicionales. Un ingrediente habitual es el suero a una concentración del 0,5-60%. En la realización preferida de la presente invención, se utiliza suero humano a una concentración menor del 5% y más preferentemente a una concentración del 2%. Adicionalmente, con el desarrollo de medios asépticos, puede ser posible omitir completamente el suero. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) estimula la migración de los queratinocitos y retrasa su senescencia dando lugar a la estimulación de la proliferación. La toxina del cólera, la hidrocortisona, la insulina, la adenina y la triyodotironina tienen un efecto estimulante de la proliferación. Todos estos ingredientes son por tanto útiles en un medio para preparar equivalentes epidérmicos. Sin embargo, puede ser posible omitir o sustituir uno u otro de estos ingredientes.

Los productos de liberación de componentes sanguíneos (por ejemplo, plaquetas sanguíneas, monocitos o linfocitos) pueden servir como una fuente de actividades proliferativas celulares y por lo tanto pueden sustituir al suero y proporcionar otros ingredientes anteriormente mencionados. En determinados periodos de cultivo el medio con suero podría posiblemente sustituirse por un medio aséptico, definido, por ejemplo, SFM (Gibco Europe, Ettligen). Los productos de liberación de componentes sanguíneos (por ejemplo, plaquetas sanguíneas, monocitos o linfocitos), especialmente de origen homólogo o autólogo, pueden servir como una fuente de actividades proliferativas celulares y por lo tanto pueden sustituir al suero y proporcionar otros ingredientes anteriormente mencionados. Los componentes sanguíneos deben añadirse al medio de cultivo a una concentración del 0,1% al 20%, y preferentemente del 1% al 5%, después de que el producto liberado se lleve al mismo volumen final que la sangre a partir de la cual se obtienen estos componentes. Estos productos de liberación contienen diversos factores de crecimiento que se encuentran en el suero (por ejemplo, PDGF, ECF o TGF). Sin embargo, el suero, así como los productos de liberación, contiene muchas sustancias y no todas están caracterizadas.

El producto de liberación de plaquetas sanguíneas se obtiene centrifugando sangre entera anticoagulada, preferentemente sangre humana, para sedimentar todas las células, excepto los trombocitos. El sobrenadante se centrifuga una vez más para centrifugar los trombocitos. Los trombocitos se suspenden en un tampón apropiado, por ejemplo, tampón fosfato y se tratan con trombina para liberar sus gránulos alfa que contienen una mezcla de diversos factores de crecimiento (por ejemplo, PDGF, PF-4, TGF- β , EGF, β -tromboglobulina). En una etapa de centrifugación posterior, se elimina todo el material celular. Finalmente, el sobrenadante se complementa con tampón hasta el volumen de la muestra original de sangre de la que se obtienen los componentes. Los componentes sanguíneos deben añadirse al medio de cultivo a una concentración del 0,1% al 20%; preferentemente del 1% al 10%; y más preferentemente del 2 al 5%.

De manera similar, los productos de liberación pueden obtenerse a partir de otras células sanguíneas, tales como monocitos, rompiendo las células (por ejemplo, mediante ultrasonidos, procedimiento de congelación-descongelación, o similar) y purificando los factores de crecimiento (por ejemplo, mediante filtración o mediante procedimientos inmunológicos).

Los productos de liberación de los componentes sanguíneos también pueden utilizarse para acondicionar el lecho de las heridas durante el injerto de los equivalentes epidérmicos o dérmicos. Además, el medio de cultivo que contiene los productos de liberación y que se utiliza para realizar la etapa de cultivo organotípico, después de haber sido acondicionado por las células, puede utilizarse para acondicionar el lecho de defectos de la piel durante el injerto de los equivalentes epidérmicos o dérmicos.

El cultivo se realiza habitualmente en insertos con membranas microporosas, que contienen fibroblastos dérmicos humanos (FDH) homólogos o autólogos, especialmente FDH postmitóticos en su superficie inferior. Los FDH secretan factores que acondicionan el medio para obtener un mejor crecimiento de los equivalentes epidérmicos. La capa de FDH puede estar formada entre 1×10^3 a 1×10^5 células/cm² y preferentemente, aproximadamente entre $1 \times$

10^4 a 5×10^4 células/cm². Los FDH son preferentemente postmitóticos, pero pueden utilizarse células de fase precoz si se irradian, se tratan con mitomicina-C, o se tratan de otro modo para inhibir su proliferación aunque conservando su metabolismo, es decir, reduciendo la concentración sérica.

5 En una forma de realización, el grosor del injerto para los equivalentes del complejo dérmico (“complejo de piel”) no supera los 0,4 mm.

10 Las membranas microporosas son apropiadas como un sustrato de cultivo, porque permiten difundir las sustancias de un lado al otro, pero actúan como una barrera para las células. El tamaño del poro de la membrana no constituye una limitación en la presente invención, pero debe ser adecuado como para permitir la difusión de proteínas de hasta un peso molecular de 100.000 Daltons, y preferentemente de un peso molecular de hasta 70.000 Daltons. La membrana debe permitir al menos la difusión de pequeñas hormonas, tales como insulina, y permitir el paso de proteínas de hasta 15.000 Daltons de peso molecular. También podrían utilizarse otros medios que no sean una membrana microporosa para realizar la función de permitir la difusión de factores solubles a las células ORS cultivadas, evitando al mismo tiempo la mezcla de las células ORS con los FDH.

15 En la técnica se utilizan normalmente las membranas microporosas típicas. Sin embargo, también pueden utilizarse membranas fabricadas a partir de un material biodegradable (por ejemplo, ácido polihialurónico o ácido poliláctico). Cuando se emplea una membrana microporosa biodegradable se considera que todo el cultivo, incluyendo las células ORS diferenciadas, la membrana microporosa y los FDH, se trasplantará en el defecto de la piel. De este modo, en esta realización alternativa, los FDH que crecen en el lado inferior de la membrana, no necesitan ser postmitóticos o tratarse para impedir la proliferación. Aunque los FDH tienden a ser menos inmunogénicos que los queratinocitos, es preferible que cuando se emplee esta realización, los FDH sean células alogénicas, preferentemente células autólogas.

20

25 En una realización, el grosor del injerto de malla puede variar de 30-300 micrómetros. Preferentemente, el grosor del injerto de malla varía de 0,5-0,75 mm. Un injerto de tejido (por ejemplo, colágeno dérmico más fibroblastos recubierto con tejido queratinocítico) que sea demasiado grueso puede dar lugar a una muerte celular isquémica demasiado rápida, especialmente para la capa de queratinocitos situada por encima de la capa de colágeno fibroblástico dérmico. Por el contrario, este tejido de injerto de malla puede “prender” en los sitios de la herida.

Los equivalentes epidérmicos de la presente invención pueden variar de tamaño de aproximadamente 6 mm a aproximadamente 2,5 cm, con un diámetro preferido de 2,5 cm. Por razones prácticas, los experimentos desvelados en el presente documento se realizaron con equivalentes epidérmicos de aproximadamente 2,5 cm de diámetro.

30 En una realización, el intervalo preferido para los equivalentes epidérmicos es de 50-150 micrómetros. En una realización particular, los equivalentes epidérmicos son muy finos (más finos de lo que habitualmente se utiliza en la técnica, por ejemplo, 60 micrómetros). Se ha planteado la hipótesis de que haciendo el injerto autólogo demasiado grueso se evitaría un suministro de sangre a partir de que se haya establecido, de forma que la epidermis no “prendería” en el sitio de la herida. Por el contrario, los equivalentes epidérmicos de la invención, pueden “prender” en los sitios de la herida.

35

40 Sin embargo, en muchos casos la piel o los equivalentes epidérmicos tendrán que suministrarse desde el centro en el que se generan a la institución en la que se utilizan. Por lo tanto, se necesita un sistema que permita el transporte de la piel o de los equivalentes epidérmicos, que los conserve en condiciones listas para realizar el injerto. Independientemente de si la membrana microporosa se elimina de la capa celular basal antes del transporte, parecen ser favorables condiciones que se asemejen a aquellas durante el cultivo. Para mantener la piel o los equivalentes epidérmicos en contacto con el medio solo de la capa basal, (es decir, durante el cultivo) puede utilizarse agarosa a una concentración que varía del 0,1% al 5% y preferentemente a una concentración del 0,5% al 1%, o metilcelulosa, o cualquier otra sustancia gelificante a concentraciones comparables, para solidificar el medio de transporte. La piel o los equivalentes epidérmicos se colocarán con su capa basal hacia abajo sobre la membrana de un inserto previamente incrustada en la parte superior del medio solidificado o gelificado. La placa multipocillo que contiene estos insertos se coloca después en un blíster precintado mediante una cubierta de tipo Tyvek, y se transporta. La piel o los equivalentes epidérmicos se utilizan, más preferentemente, para realizar injertos en un plazo de 24 a 48 horas desde el envasado inicial.

45

50 Para mejorar la estabilidad de los equivalentes epidérmicos, se ha desarrollado la técnica de colocar una membrana transportadora en la parte superior, es decir, sobre el aspecto cornificado de los equivalentes epidérmicos, y eventualmente, adherirla a él. Como adhesivo, se prefiere cola de fibrina, sin embargo, también pueden utilizarse otras opciones, que incluyen, pero sin limitación: componentes de la matriz extracelular, tales como colágeno, fibronectina, proteoglicanos (por ejemplo, ácido hialurónico, condroitín sulfato, y similares) o componentes de la zona de la membrana basal (por ejemplo, laminina, MatrigelTM o L-polilisina) o colas titulares similares.

55 Los transportadores utilizados en la presente invención pueden consistir en una membrana sintética fabricada con uno o más de los siguientes materiales (poliéster, PTFE o poliuretano); uno o más polímeros biodegradables (por ejemplo, ácido hialurónico, ácido poliláctico o colágeno); o un apósito de gasa de vaselina o silicona o cualquier otro material apropiado para el vendaje de heridas. Estos materiales, que son apropiados para el vendaje de heridas,

5 permiten que el transportador permanezca en el sitio para inmovilizar durante varios días los equivalentes dérmicos o epidérmicos implantados, en lugar de tener que quitarlo inmediatamente después de trasplantar los equivalentes dérmicos o epidérmicos. Por tanto, el transportador no sólo potencia la estabilidad y mejora la manipulación, sino que también sirve como revestimiento protector contra daños físicos, así como para el medio proteolítico y las bacterias en la herida. Además, sirve para la orientación del injerto (es decir, el lado basal hacia abajo, el cornificado hacia arriba).

10 Los equivalentes de la piel o epidérmicos dispuestos sobre el transportador tienen que mantenerse en una condición lista para realizar el injerto. Independientemente de si la membrana microporosa se elimina de la capa celular basal para el transporte, parecen ser favorables condiciones que se asemejen a aquellas durante el cultivo. Para mantener la piel o los equivalentes epidérmicos en contacto con el medio solo de la capa basal, (es decir, durante el cultivo) puede utilizarse agarosa a una concentración que varía del 1% al 5% y preferentemente a una concentración del 1 al 3%; metilcelulosa; o cualquier otra sustancia gelificante a concentraciones comparables, para solidificar el medio. Los equivalentes epidérmicos junto con el transportador se colocarán con su capa basal en la parte superior del medio solidificado o gelificado. Después, se precinta todo el dispositivo de manera hermética y se transporta. Los equivalentes epidérmicos se utilizan, más preferentemente, para realizar injertos en un plazo de 24 horas desde su envasado inicial.

20 Los equivalentes de la piel o epidérmicos se trasplantan colocándolos simplemente en el lecho de la herida o de otro defecto de la piel. Preferentemente, los equivalentes de la piel o epidérmicos se inmovilizan después (a los pacientes se les inmoviliza durante 2 horas). El procedimiento preferido para la inmovilización se realiza utilizando material biodegradable, mediante algún tipo de cola tisular o mediante un vendaje adecuado. Como se ha descrito previamente, el lecho del defecto de la piel puede tratarse con productos de liberación sanguínea o con el medio del cultivo organotípico antes del, simultáneamente con, el trasplante.

25 En operaciones que utilizan dispositivos de células encapsuladas (membrana de 100 micrómetros, 200-250 micrómetros en el centro de la fibra hueca), se ha obtenido, a distancias de 300 micrómetros desde el vaso sanguíneo más cercano, una buena supervivencia de los fibroblastos dérmicos humanos.

Ejemplo 1

Preparación de células ORS

30 Las células precursoras de queratinocitos de la vaina externa de la raíz (ORS) de los folículos pilosos, se seleccionan y posteriormente se cultivan utilizando la siguiente metodología, como se desvela en la presente invención.

35 Con unas pinzas se depilaron aproximadamente 40 folículos pilosos del cuero cabelludo occipital de los individuos, y los que se encontraban en la fase anágena, detectados, por ejemplo, por las vainas bien desarrolladas de las raíces, se seleccionaron después al microscopio de disección (véase por ejemplo, Limat y Noser, 87 J. Invest. Dermatol. 485-488 (1986); Limat y col., 92 J. Invest. Dermatol. 758-762 (1989)). El cabello anagénico se colocó directamente en el inserto de cultivo microporoso sin realizar la microdisección, previamente utilizada para eliminar los bulbos pilosos y la vaina pilosa infundibular.

40 Generalmente, se explantaron seis cabellos anagénicos sobre la membrana microporosa de un inserto del cultivo celular (Costar), que en su superficie inferior llevaba una capa alimentadora preformada, que estaba comprendida preferentemente por 20×10^3 fibroblastos dérmicos humanos (FDH) postmitóticos por cm^2 (véase, por ejemplo, Limat y col., 92 J. Invest. Dermatol. 758-762 (1989)). Los FDH derivaban de explantes de piel de individuos sanos, repetidamente negativos desde el punto de vista serológico para el HIV y la hepatitis y se cultivaron en medio DMEM complementado con suero fetal de ternero (FCS), o preferentemente suero humano a menos del 5% o más preferentemente suero humano al 2%.

45 Con el fin de obtener un resultado eficaz de las células de la vaina externa de la raíz (ORS) del cabello anagénico y una alta tasa de proliferación, es importante no colocar las células alimentadoras de FDH en la parte inferior de la placa de cultivo, que da lugar a una capa media adicional entre la capa de FDH y la membrana microporosa que da soporte a las células ORS. El crecimiento de cada tipo celular a un lado de la membrana permite una interacción muy estrecha, pero evita la contaminación cruzada de las células ORS con los fibroblastos, y de este modo, garantiza un cultivo puro de células ORS.

50 El medio de cultivo utilizado consistió en medio de Eagle modificado por Dulbecco/F12 (3:1 vol/vol) complementado con suero humano al 2%, 10 ng de factor de crecimiento epidérmico por ml de medio de cultivo, 0,4 microgramos de hidrocortisona por ml, adenina 0,135 mM y triyodotironina 2 nM (obtenido todo en Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). La concentración final de Ca^{2+} del medio de cultivo preferida es de 1,5 mM (véase, por ejemplo, Wu y col., 31 Cell 693-703 (1982); Limat y Noser, 87 J. Invest. Dermatol, 486-488 (1986)). A las 2 semanas aproximadamente, las células ORS se habían expandido y alcanzado la confluencia. Se disociaron con una mezcla de tripsina al 0,1%/EDTA al 0,02%, se controlaron con respecto a la viabilidad, y se utilizaron para la preparación de equivalentes dérmicos. Debe observarse que, aunque los cultivos iniciales se habían realizado utilizando suero fetal de ternero al 10% (FCS; Boehringer Mannheim, Alemania), la utilización habitual de suero humano, para reducir el número de

ingredientes alogénicos, proporcionó un resultado superior y la proliferación de las células ORS. El suero humano se utiliza preferentemente a una concentración menor que el 5%, y más preferentemente a una concentración del 2%.

5 La explantación de cabellos anagénicos depilados realizada directamente sobre la membrana de insertos del cultivo que transportaban, como células alimentadoras, FDH postmitóticos en la superficie inferior, demostró ser un procedimiento sencillo, eficaz y reproducible para establecer cultivos primarios de células ORS. El 80% aproximadamente de los folículos pilosos explantados dieron lugar a la producción de células ORS, incluso cuando procedían de individuos mayores de 90 años. Después de 14 días, amplias áreas del inserto se cubrieron por pequeñas células dispuestas de manera compacta, momento en el cual se utilizaron para la preparación de los equivalentes epidérmicos de la presente invención.

10 La comparación del comportamiento del crecimiento de 70 cepas de células ORS, que procedían de un total de 30 donantes, demostró que no había diferencias significativas entre donantes jóvenes (es decir, 21 donantes con edades comprendidas entre 19 y 50 años) y donantes de más edad (es decir, 9 donantes con edades comprendidas entre 51 y 93 años). Por lo general, se obtuvieron 5×10^5 células aproximadamente por folículo explantado, y el grado total de viabilidad celular fue típicamente superior al 95%. Por el contrario, en ausencia de FDH postmitóticos, como capa alimentadora, sólo se encontró una producción esporádica de células ORS a partir de los folículos explantados.

Ejemplo 2

Preparación de equivalentes epidérmicos

20 Se sembraron células ORS recuperadas de cultivos primarios a una densidad de 30×10^3 células/cm² a 100×10^3 células/cm², preferentemente 60×10^3 células/cm², sobre insertos de cultivos celulares (Costar) que previamente se habían inoculado con 10×10^3 células/cm² a 50×10^3 células/cm², y preferentemente 20×10^3 células/cm², de células FDH postmitóticas sobre la superficie inferior de su membrana microporosa. De manera similar al cultivo de células ORS, es importante mantener las células alimentadoras FDH muy cerca de las células ORS, manteniéndolas simultáneamente separadas utilizando la membrana microporosa. Esta técnica de cultivo potencia la proliferación, diferenciación y por tanto, la homeóstasis del tejido en desarrollo.

25 El medio de cultivo fue idéntico al utilizado para la preparación de los cultivos primarios, como se describe anteriormente. Después de 72 horas, las células ORS se expusieron al aire aspirando el medio líquido del interior del inserto (es decir, dejando de estar en contacto el lado inferior del inserto con el medio) y se cultivaron durante 12-14 días más, con tres cambios de medio por semana. Como alternativa, después de una semana el suero levantado del cultivo puede omitirse totalmente.

30 Para el trasplante, el protocolo utilizado hasta ahora, que se emplea generalmente para la preparación del equivalente epidérmico completamente diferenciado para el injerto de la herida, requiere que el médico corte cuidadosamente todo el perímetro del inserto del cultivo con un bisturí para facilitar la liberación de la membrana del inserto (con los fibroblastos dérmicos humanos revestidos por debajo) con el parche dérmico escamoso unido hacia arriba. El parche dérmico se retira después de esta membrana desprendiéndolo con una pinzas finas y colocándolo, con la cara basal hacia arriba, sobre una nueva placa de membrana en una placa de cultivo para un trasplante eventual al paciente. Este procedimiento mencionado anteriormente es laborioso y requiere mucho tiempo y puede conducir a la inversión de la orientación basal y escamosa.

35 Se ha ideado un procedimiento notablemente más sencillo que utiliza un tapón del parche de la membrana transportadora, que utiliza un tapón del parche de la membrana (análogo al procedimiento del parche de cola de fibrina descrito a continuación) que se coloca directamente sobre la parte superior de la capa superficial escamosa. El tapón de la membrana puede después sujetarse junto con el parche dérmico inferior, utilizando un pequeño bisturí y desprendiéndolo de la superficie del pocillo del inserto del cultivo, y, por ejemplo, después de incubación en solución de Dispasa diluida, desprenderse de la membrana del inserto del cultivo. La membrana puede entonces servir de placa para colocar el injerto sobre la herida sin confundir la orientación del inserto (es decir, lado basal hacia abajo, lado escamoso hacia arriba).

40 Para la estabilización y como un revestimiento protector en caso de injerto, los equivalentes epidérmicos de la presente invención se revisten en la parte superior con cola de fibrina diluida, que también sirve para identificar claramente el lado superior (es decir, cornificado). La cola de fibrina, la realización preferida de la presente invención, es un producto humano natural, generalmente aceptado, muy utilizado como una cola tisular. Aplicando un fino revestimiento de cola de fibrina (que es claramente visible a simple vista) a la superficie escamosa cornificada expuesta al aire del equivalente epidérmico, y colocando el médico el equivalente epidérmico sobre el sitio de la herida, estará completamente asegurada la orientación apropiada del injerto (es decir, la superficie basal del parche dérmico estará siempre en el lado en el que no se aprecia claramente el tapón de cola de fibrina).

45 Previamente, en muchos casos, durante la preparación del parche epidérmico para el injerto en la herida, la orientación del parche se vuelve confusa. Si el parche dérmico se coloca orientado por debajo del lado escamoso, sobre el lugar del injerto, disminuirá significativamente la posibilidad de un injerto con éxito. Por tanto, la utilización de este sencillo "marcado" elimina completamente este problema.

Además, también pueden incluirse sustancias antimicrobianas y/o antifúngicas en la cola de fibrina, para impedir cualquier contaminación microbiana posible o el sobrecrecimiento del injerto. Muchas lesiones crónicas se infectan crónicamente, lo que puede conducir a la inhibición del "prendimiento" del injerto, y cicatrización posterior de la herida, después del injerto inicial de piel. Además, la adición de uno o más antibióticos o agentes antifúngicos por emulsificación directa en el interior del tapón superficial de la cola de fibrina, puede proporcionar una mejoría significativa en la administración de cantidades suficientes de agentes anti-microbianos al lugar del trasplante.

Debe observarse que las células ORS que se recuperaron de los cultivos primarios y se cultivaron en la interfase aire-líquido sobre las membranas de inserto que transportan los FDH postmitóticos en su superficie inferior, desarrollaron típicamente un epitelio estratificado a los 14 días. Este epitelio estratificado consistía en una capa basal de pequeñas células cuboides, por debajo de un compartimiento suprabasal grueso de células progresivamente aplanadas. Una capa granular prominente, así como una capa córnea ortoqueratótica se encontraron también presentes.

Basándose en el hallazgo experimental de que un 80% aproximadamente de los folículos dieron lugar a la producción de células ORS, se necesitaron aproximadamente cinco folículos pilosos anagénicos para la generación de 1 cm² de equivalentes epidérmicos. El período para generar equivalentes epidérmicos capaces de injertarse fue habitualmente de cuatro semanas en total (es decir, dos semanas para el cultivo primario y dos semanas para el cultivo organotípico posterior).

Ejemplo 3

Estabilización

Antes del suministro, los equivalentes epidérmicos se revisten en la parte superior colocando una membrana de silicona de un diámetro apropiado sobre el aspecto superior cornificado de los cultivos. Para potenciar adicionalmente la estabilidad, por ejemplo, en el caso de equivalentes epidérmicos grandes y/o finos, así como para aumentar la adhesión de la membrana de silicona, antes puede aplicarse una fina capa de cola tisular, por ejemplo, cola de fibrina.

El revestimiento sobre la parte superior, (1) potencia la estabilidad y mejora la manipulación de los injertos, y (2) sirve como un revestimiento protector contra el daño físico, así como para el medio proteolítico y las bacterias en la herida.

Ejemplo 4

Transporte

Los equivalentes epidérmicos revestidos en la parte superior se separan de las membranas del inserto del cultivo por incubación en Dispasa diluida y después sujetan los equivalentes epidérmicos junto con la membrana de silicona utilizando pinzas finas y transfiriéndolos a la membrana de un inserto previamente incrustada en agarosa al 0,7% empapada con medio de cultivo en el pocillo de una placa multipocillo. Estas placas se colocan después en el envase de transporte. Para la aplicación al lecho de la herida, los equivalentes dérmicos se sujetan de nuevo, junto con la membrana de silicona, que (1) sirve para la orientación del injerto (es decir, el lado basal hacia abajo, el cornificado hacia arriba) y (2) dejándolo sobre los equivalentes epidérmicos injertados en la herida sirve como revestimiento protector (véase anteriormente).

Ejemplo 5

Tratamiento satisfactorio de úlceras crónicas de las piernas con equivalentes epidérmicos generados a partir de células cultivadas autólogas de la vaina externa de la raíz.

Las células de la vaina externa de la raíz de los folículos pilosos pueden sustituir a los queratinocitos epidérmicos interfoliculares, pues durante la cicatrización de las heridas de la piel, estas células migran sobre el área desnuda y contribuyen a la regeneración epidérmica (Limat y col., 107 (1) J. Invest. Dermatol. 128-35 (1996) que se incorpora por referencia). Utilizando las técnicas mejoradas del cultivo de la invención, se generaron equivalentes epidérmicos a partir de células de la vaina externa de la raíz de pacientes que padecían úlceras crónicas recalcitrantes de las piernas, principalmente de origen vascular. En dichos equivalentes epidérmicos, la organización tisular así como la inmunolocalización de los productos de diferenciación epidérmicos (queratina 10, involucrina, filagrina) e integrinas, no pudieron diferenciarse de la epidermis normal. Como se determina por el número de células que incorporaban bromodesoxiuridina, la capa basal contenía un gran compartimento de células proliferativas independientemente de la edad del donante. El análisis mediante FACS de las células de la vaina externa de la raíz, utilizadas para preparar los equivalentes epidérmicos, desveló una fracción de células pequeñas con expresión de la $\beta 1$ -integrina aumentada, un marcador de células madre potencial. Al contrario que en las heridas agudas, en las heridas crónicas no se ha demostrado de modo convincente un prendimiento definitivo superior de queratinocitos autólogos cultivados trasplantados. El injerto de equivalentes epidérmicos generado in vitro a partir de las células autólogas de la vaina externa de la raíz en 11 úlceras en cinco pacientes dio lugar a una tasa de prendimiento definitivo de aproximadamente 80%, con una cicatrización posterior completa entre las 2 y 3 semanas, de 5 de 7 úlceras

sometidas a injerto con cultivos densamente preparados. Esta mejoría en el tratamiento de úlceras crónicas de las piernas con queratinocitos autólogos cultivados depende probablemente del gran compartimiento de células proliferativas así como de una capa córnea bien desarrollada que evita la disgregación de los injertos. Las ventajas prácticas de la nueva técnica son su no invasividad, la falta de la necesidad de instalaciones quirúrgicas o anestesia y un corto período de inmovilización después del injerto.

Experimentos *In Vitro*. Cultivos celulares. Se depilaron aproximadamente 40 folículos pilosos del cuero cabelludo occipital de individuos que tenían 91 años, y con el microscopio de disección se seleccionaron los que estaban en fase anagénica. Los bulbos pilosos, así como las partes infundibulares, se retiraron con cuchillas microquirúrgicas. Normalmente, se explantaron seis folículos en la membrana microporosa de un inserto de cultivo celular (Falcon 3090; Becan Dickinson, Franklin Lanes, NJ) que llevaba en su superficie inferior una capa alimentadora preformada constituida por 10^5 fibroblastos dérmicos humanos postmitóticos. El medio de cultivo consistía en medio de Eagle modificado por Dulbecco/F12 (3:1) complementado con suero fetal de ternero al 10 % (Boehringer Mannheim, Alemania), 10 ng de factor de crecimiento epidérmico por ml, 0,4 µg de hidrocortisona por ml, toxina del cólera 0,1 nM, adenina 0,135 mM y triyodotironina 2 nM (todos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), concentración final de Ca^{2+} 1,5 mM. Aproximadamente en 2 semanas, las células ORS se expandieron y alcanzaron la confluencia. Se disociaron con tripsina/EDTA al 0,1% / 0,02 %, se controlaron con respecto a la viabilidad y crecieron bien en cultivos secundarios en medio de crecimiento con queratinocitos (KGM que contenía Ca^{2+} 0,15 mM; PromoCell, Heidelberg, Alemania) o se usó para análisis de citometría de flujo y preparación de equivalentes epidérmicos (véase más adelante). Para la conservación a largo plazo en nitrógeno líquido, se congelaron en KGM que contenía suero fetal de ternero al 10 % y dimetilsulfóxido al 10 %.

Para comparar, también se establecieron cultivos primarios de células ORS por tripsinización de los folículos pilosos y las células ORS disgregadas se sembraron en placa sobre una capa alimentadora previamente formada constituida por fibroblastos postmitóticos, como se ha descrito previamente (Limat y col, 1989). Para evitar confusiones, los folículos obtenidos mediante este procedimiento se denominaron "folículos tratados con tripsina."

Los fibroblastos procedían de explantes de la piel de un individuo sano, serológicamente negativo al VIH y a la hepatitis y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero fetal de ternero al 10 %.

Citometría de flujo. Se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón del subtipo IgG₁ que reaccionaban con diferentes cadenas de integrina: 4B4 con la cadena β_1 (Coulter, Hialeah, FL), 5E8 con la cadena α_2 , J143 con la cadena α_3 , Lv 230 con la cadena α_v y MT78 con la cadena α_6 . El mAb 439-9B reconoce la cadena β_4 .

Las células ORS a 1×10^6 /ml se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato, suero fetal de ternero al 1 % y NaN_3 al 0,02 % a 4 °C y se reconstituyeron con 1 ml del mismo tampón. Después se incubó una suspensión celular de 100 µl con 0,1 µg de los mAb o anticuerpo isotipo de control (Dako, Glostrup, Dinamarca) durante 25 minutos a 4 °C. Después de lavarse dos veces con el mismo tampón, las células se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón marcado con ficoeritrina (Dako) durante otros 25 minutos a 4 °C, se lavaron de nuevo y posteriormente se fijaron con el tampón mencionado anteriormente complementado con paraformaldeído al 2 %. La células se analizaron en un citómetro de flujo de perfil II EPICS a escala logarítmica de 4 equipado con un generador y los datos se analizaron usando el programa informático ELITE (Coulter).

Equivalentes epidérmicos. Las células ORS recuperadas de los cultivos primarios se sembraron a una densidad de 5×10^5 /cm² sobre insertos de cultivo celular (Falcon 3095) que llevaban 5×10^4 fibroblastos postmitóticos en la superficie inferior de su membrana microporosa. El medio de cultivo era el mismo que para la preparación de cultivos primarios. Después de 24 horas, las células ORS se expusieron al aire por aspiración del medio dentro del inserto y después se cultivaron durante 12 a 14 días con los tres cambios de medio por semana. En algunos cultivos, se añadió 5-bromo-2'-dexosiridina (BrdU; Sigma) 65 µM, durante las 18 horas finales.

Para el análisis histológico, los equivalentes epidérmicos se extirparon del inserto con un punzón de 6 mm (Stiefel Laborarium, Offenbach am Main, Alemania), se fijaron en formalina al 5 % y se procesaron adicionalmente junto con la membrana de inserto subyacente de acuerdo con procedimientos convencionales. Para el examen inmunohistológico, los equivalentes epidérmicos se punzaron de manera similar, pero después se separaron de la membrana de inserto mediante unas pinzas finas, se congelaron de manera instantánea en isopentano enfriado con nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta el procesamiento.

Para la inmunofluorescencia indirecta, secciones criostáticas de 6 µm se secaron al aire, se fijaron con acetona/etanol (1:1) enfriado con hielo, se rehidrataron con solución salina tamponada con fosfato, se bloquearon durante 15 minutos con suero no inmune y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos con los anticuerpos primarios y, después de un extenso lavado, durante 45 minutos con los anticuerpos secundarios. Como anticuerpos primarios se utilizaron los siguientes mAb: Ks 8,60, que principalmente reaccionaba con queratina (K) 10 y débilmente con K1, diluido a 1:20 (Sigma); anti-involucrina humana, diluido a 1:100 (Sigma); anti profilagrina/filagrina humana, diluido a 1:100 (BTI, Saughan, MA); 4B4 dirigido contra la cadena β_1 -integrina, diluido a 1:10 (Coulter). Los mAb secundarios contra IgG de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína se adquirieron en Sigma. Como controles negativos, se incubaron secciones con suero no inmune y anticuerpos

secundarios conjugados, que en contados casos manifestaron una tinción difusa débil de áreas completamente queratinizadas.

Para determinación de células positivas a BrdU, las secciones criostáticas se desnaturalizaron en HCl 1,5 M y se incubaron sucesivamente con Hoechst 33258 0,5 µg/ml, durante 30 minutos, mAb anti-BrdU (Partec, Arlesheim, Suiza) diluido a 1:100 durante 45 minutos, e isotiocianato de fluoresceína unido a anti-IgG de ratón (Sigma) diluido a 1:30 durante 45 min. El porcentaje de células positivas a BrdU en la capa basal se determinó en equivalentes epidérmicos preparados a partir de células ORS de pacientes con úlceras en las dos piernas que tenían de 72 y 91 años (n = 4; dos equivalentes epidérmicos por paciente). Para cada equivalente epidérmico, se contaron aproximadamente 2.500 núcleos localizados basalmente en 10 secciones seleccionadas al azar.

Para el trasplante, los equivalentes epidérmicos se extirparon del inserto junto con la membrana subyacente usando un punzón de 6-mm (Stiefel Laboratorium) y se colocaron al revés sobre una membrana de poliéster perforada (Thomapor 95877; Reichelt Chemie, Heidelberg, Alemania) de 6 mm de diámetro. En un paciente, se prepararon del mismo modo equivalentes epidérmicos adicionales de 8 mm de diámetro. La membrana de inserto junto con los fibroblastos postmitóticos adheridos se retiró cuidadosamente con una pinzas finas. Los equivalentes epidérmicos sobre su membrana de poliéster de soporte se lavaron en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco y se dejaron flotando en su interior hasta su aplicación sobre el lecho de la herida, normalmente durante no más de 30 minutos.

Injerto autólogo en úlceras crónicas de las piernas. Con la aprobación del Comité Ético de la Universidad de Berna y tras obtener el consentimiento informado por escrito, cinco pacientes hospitalizados (un varón, cuatro mujeres, con edades de 58 a 91 años) que padecían úlceras crónicas recalcitrantes en las piernas (cuatro de ellos con más de dos úlceras en la misma pierna, duración al menos de cuatro años; enfermedad venosa o arterial y venosa mixta en cuatro, en uno diabetes mellitus adicional, linfoedema primario en uno) se incorporaron en un estudio piloto. Las úlceras se limpiaron de manera convencional (principalmente con apósitos hidrocoloidales y agentes antimicrobianos tópicos) hasta estar listas para el injerto. Después se colocaron hasta 20 equivalentes epidérmicos autólogos, normalmente de 6 mm, en una úlcera de 8 mm de anchura, con la capa basal hacia abajo sobre la superficie de las úlceras y las membranas de poliéster de apoyo se retiraron cuidadosamente con pinzas finas. Este procedimiento de injerto se realizó en el hospital; sin anestesia. En cuatro de los pacientes, otras úlceras en la misma pierna sirvieron como controles. Todas las úlceras se taparon después con un apósito transparente, semioclusivo (Tegaderm; 3M, Londres, Canadá) revestido por un vendaje elástico con compresión adaptada al estado arterial del paciente. Inmediatamente después del injerto se inmovilizó a los pacientes durante 2 horas. Después de 3 días, el apósito semioclusivo se retiró cuidadosamente y se aplicó un apósito hidropolimérico (Tielle: Johnson & Johnson Medical, Ascot, UK) de nuevo revestido por el vendaje elástico. Los apósitos hidropoliméricos se cambiaron después cada 2 a 5 días. Después del tratamiento local de re-epitelialización completa se cambió a emolientes tópicos y se enseñó a los pacientes a seguir una terapia de compresión a largo plazo adaptada a su estado arterial. El prendido de los injertos y la cicatrización de las úlceras se documentaron mediante fotografías convencionales tomadas cada vez que se cambiaban los apósitos.

Las células ORS In Vitro se diferencian en los equivalentes epidérmicos de manera similar a la epidermis normal. La explantación de los folículos pilosos anagénicos depilados directamente sobre la membrana de los insertos del cultivo que llevan fibroblastos postmitóticos como células alimentadoras en su superficie inferior, demostró ser una herramienta sencilla, eficaz y reproducible para establecer cultivos primarios de células ORS. Alrededor del 80 % de los folículos pilosos explantados dio lugar a la producción de células ORS, incluso cuando procedían de individuos que tenían una edad de hasta 91 años. Después de 14 días, grandes áreas del inserto se cubrieron con células pequeñas organizadas de manera compacta, momento en el cual se utilizaron para la preparación de los equivalentes epidérmicos. Por el contrario, las células ORS procedentes de los folículos tratados con tripsina mostraron una organización menos compacta con numerosas células de un tamaño menor. La comparación del comportamiento del crecimiento de 70 cepas de células ORS derivadas de 30 donantes no reveló diferencias significativas entre donantes jóvenes (21 donantes con edades de 19 a 50 años) y donantes mayores (9 donantes con edades de 51 a 93 años), ya que normalmente se obtuvieron aproximadamente $0,5 \times 10^6$ células por folículo explantado. La viabilidad celular fue mayor que el 95 %. En ausencia de los fibroblastos postmitóticos, solo hubo una producción esporádica de células ORS.

Debido a que se ha postulado una relación lineal logarítmica entre el nivel relativo de β_1 -integrina en la superficie celular y la capacidad proliferativa de los queratinocitos, se comparó la expresión de las integrinas en cultivos primarios de células ORS establecida mediante las dos técnicas distintas, es decir, células ORS procedentes de folículos explantados o de folículos tratados con tripsina. Las células ORS procedentes de cuatro donantes distintos que se desarrollaron mediante ambas técnicas se analizaron por citometría de flujo. Basándose en sus características de dispersión de luz, las células pudieron subdividirse en dos grupos; el grupo A, con una dispersión de luz directa claramente inferior, es decir, de un tamaño celular más pequeño, y el grupo B, con una dispersión de luz directa superior, teniendo por tanto un tamaño celular más grande. Para las células ORS procedentes de folículos explantados, el grupo A representó aproximadamente el 4 % y el grupo B representó aproximadamente el 72 % del número total de células, mientras que se encontraron valores de 2,6% y 75 %, respectivamente, para las células ORS que crecieron a partir de folículos tratados con tripsina (valores promedio de cuatro experimentos distintos). En el grupo A, los valores porcentaje de células que se tiñeron debido a las integrinas β_1 - β_4 así como el de

la fluorescencia promedio por célula de las integrinas β_1 y, en un menor grado, también de las integrinas α_2 , α_3 , α_v , fueron más altos en las células ORS desarrolladas a partir de folículos explantados que en las procedentes de los folículos tratados con tripsina. En el grupo B, no se detectaron diferencias en las dos técnicas de cultivo, ni en el porcentaje de células positivas a integrina, ni en la fluorescencia promedio por célula.

5 Las células ORS recuperadas de los cultivos primarios y sembradas en placa sobre membranas de inserto que llevaban fibroblastos postmitóticos en su superficie interior, desarrollaron un epitelio estratificado a los 14 días. Este consistía en una capa basal de células cuboides pequeñas situadas por debajo de un compartimento suprabasal grueso de células progresivamente aplanadas. Una capa granular y una capa córnea ortoqueratótica estaban presentes.

10 La inmunolocalización de los productos de diferenciación epidérmica fue idéntica a la encontrada en la epidermis normal. Por lo tanto, la diferenciación específica K10 no se encontraba en la capa basal, pero se expresó más intensamente suprabasalmente a partir de la segunda capa. La involucrina mostró su forma patrón típica de peine córneo en el estrato espinoso medio, mientras que la tinción de la capa granular de la filagrina formaba una banda continua debajo de la capa córnea. Como en la epidermis normal, la reactividad de las cadenas α_2 , α_3 y β_1 de las integrinas se distribuyó sobre todos los aspectos de la membrana plasmática de las células basales, mostrando una disminución de la intensidad con diferenciación progresiva.

Se encontraron células BrdU positivas predominantemente en la capa basal de los equivalentes epidérmicos y representó el 24 % de las células basales [597 ± 21 células BrdU positivas para 2464 ± 115 células basales (promedio ± DT): n = 4].

20 Basándose en el 80 % de los folículos que dan lugar a la producción de las células ORS, se necesitaron aproximadamente cinco folículos pilosos anagénicos para generar un 1 cm² de equivalentes epidérmicos. El periodo para generar equivalentes epidérmicos capaces de injertarse fue habitualmente de 4 semanas, es decir, 2 semanas para el cultivo primario y 2 semanas para el cultivo organotípico.

25 *Los equivalentes epidérmicos autólogos se injertan con éxito en úlceras crónicas de pierna.* Se trató un total de 11 úlceras, siete de ellas recubriendo aproximadamente el 90 % de la superficie de la úlcera con cultivos densamente dispuestos, poniendo cuatro cultivos aislados en las partes centrales. En el primer cambio de apósito 3 días después del injerto, aproximadamente el 80 % de los injertos eran visibles y adherentes al lecho de la herida en ambos tipos de tratamiento. En las 2 a 3 semanas siguientes, los injertos se consolidaron en cinco de las siete úlceras densamente injertadas, dando lugar a una re-epitelialización y cicatrización completas. En las dos úlceras restantes, infectadas crónicamente (*Pseudomonas*), los injertos se destruyeron prácticamente, lo que condujo a un retraso en la cicatrización de 4 a 5 semanas. En las úlceras tratadas mediante injertos aislados, hubo una formación acelerada de tejido de granulación y re-epitelialización principalmente desde los bordes de la herida, en comparación con las úlceras de la misma pierna tratadas solo con los apósitos. En este tipo de tratamiento, se documentó un solo un prendido permanente con posterior expansión de los injertos dando lugar a la re-epitelialización completa, para una

30 úlcera tratada con láminas epiteliales más grandes que median 8 mm de diámetro. Las úlceras de control en los cuatro pacientes con más de dos úlceras en la misma pierna, mejoraron solo ligeramente después de 3 semanas, momento en el que se trataron injertando posteriormente equivalentes autólogos epidérmicos o mediante cirugía convencional.

40 Después de la re-epitelialización, la epidermis era todavía inicialmente frágil con alguna tendencia a formar ampollas después de traumas friccionales poco importantes, dando lugar ocasionalmente a pequeñas erosiones. Estas erosiones se re-epitelizaron rápidamente con tratamiento tópico convencional. Ahora se ha realizado un seguimiento de los primeros pacientes durante 6 meses y muestran un aumento de la estabilización de las áreas tratadas y no muestran recurrencias en las úlceras.

45 A partir de la descripción detallada anterior de las realizaciones específicas de la presente invención, debería ser fácilmente evidente que se ha descrito una metodología única para la selección y el cultivo de queratinocitos procedentes de la vaina externa de la raíz (ORS) de los folículos pilosos, para utilización posterior, por ejemplo, en procedimientos de injerto de piel. Aunque en la presente invención se han descrito con detalle realizaciones particulares, esta se ha realizado a modo de ejemplo únicamente con fines ilustrativos, no teniendo la intención de limitar respecto al alcance de las reivindicaciones adjuntas descritas a continuación.

50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar *in vitro* un equivalente epidérmico o complejo de piel apropiado para el tratamiento posterior de un defecto de la piel, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 a) cultivar un folículo piloso anagénico para obtener células de la vaina externa de la raíz;
 b) cultivar dichas células de la vaina externa de la raíz para obtener células precursoras queratinocíticas; y
 c) preparar un equivalente epidérmico o complejo de piel que comprenda dichas células precursoras queratinocíticas;
- caracterizado porque** dicho folículo piloso está intacto.
- 10 2. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, en el que dichas etapas (a y b) de cultivo se realizan en un medio que contiene suero humano a una concentración inferior al 5 %.
3. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 1, en el que dichas células precursoras queratinocíticas se siembran a una densidad comprendida entre 3×10^4 células/cm² y 1×10^5 células/cm².
4. Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 **caracterizado por** seleccionar dichas células precursoras queratinocíticas mediante:
- 15 d) cultivo primario de dichas células precursoras queratinocíticas derivadas de la vaina externa de la raíz mediante adhesión de dicho cabello anagénico intacto a una membrana microporosa, llevando dicha membrana, en su superficie inferior, células alimentadoras de crecimiento detenido/limitado para seleccionar células precursoras queratinocíticas a partir de la vaina externa de la raíz del cabello;
- 20 e) cultivo organotípico de las células de la vaina externa de la raíz recuperadas de dichos cultivos primarios, modulando una membrana microporosa que también posee en su superficie inferior células alimentadoras de crecimiento detenido/limitado; y
 f) generar, después de esto, dicho equivalente epidérmico o complejo de piel para utilización posterior como un inserto de injerto colocando una membrana transportadora sobre la parte superior de dicho cultivo organotípico de la etapa d) y separando dicho equivalente epidérmico o complejo de piel;
- 25 de tal manera que dicho injerto comprende las células precursoras queratinocíticas y una membrana transportadora como una unidad laminar única, sembrándose dichas células precursoras queratinocíticas sobre dicha membrana transportadora a una densidad comprendida entre 3×10^4 células/cm² y 1×10^5 células/cm².
5. Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho equivalente epidérmico o complejo de piel se reviste en su parte superior o en su lado cornificado con una cola de fibrina.
- 30 6. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 5, en el que dicha cola de fibrina contiene uno o más agentes antimicrobianos, antifúngicos o antivirales emulsionados en la misma.
7. Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que dichas células de la vaina externa de la raíz son células homólogas.
8. Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en que dicho equivalente epidérmico o complejo de piel comprende células de la vaina externa de la raíz cultivadas en un medio que solo contiene complementos biológicos homólogos o autólogos.
- 35 9. Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho equivalente epidérmico se reviste en su parte superior o en su lado cornificado con una membrana transportadora.
10. Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichas células de la vaina externa de la raíz son células autólogas obtenidas de un individuo que posteriormente se someterá a tratamiento para un defecto de la piel.
- 40 11. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 4, en el que la densidad del cultivo de dichas células alimentadoras de crecimiento detenido/limitado sobre dicha membrana microporosa está comprendida entre aproximadamente 1×10^4 células/cm² y aproximadamente 5×10^4 células/cm².
- 45 12. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 4, en el que dichas células alimentadoras de crecimiento detenido/limitado son células depositadas en un banco o inmortalizadas.
13. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 4, en el que dicho equivalente epidérmico o complejo de piel comprende células de la vaina externa de la raíz cultivadas en un medio que solo contiene productos de liberación homólogos o autólogos de componentes sanguíneos.
- 50 14. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 13, **caracterizado porque** dicho equivalente epidérmico o complejo de piel comprende células de la vaina externa de la raíz cultivadas en un medio que solo

contiene productos de liberación homólogos o autólogos de componentes sanguíneos a una concentración de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 20 %.

- 5 15. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 4, en el que dicha membrana microporosa está revestida con una o más sustancias de la matriz extracelular seleccionadas entre fibrina, fibronectina, colágenos, lamininas e hialuronano.
16. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 4, en el que dicha membrana microporosa posee, en su superficie inferior, un sistema de células alimentadoras de crecimiento detenido/limitado, seleccionándose al menos un tipo de dichas células alimentadoras entre fibroblastos dérmicos humanos, células epidérmicas, células mesenquimales, células neuronales y células endoteliales.
- 10 17. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 4, en el que dicha membrana transportadora está fabricada con uno o más tipos de materiales seleccionados entre poliéster, PTFE, poliuretano, ácido hialurónico, ácido poliláctico, colágeno y un apósito de gasa de silicona o de vaselina.
18. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 4, en el que el tamaño de dicho equivalente epidérmico o complejo de piel se selecciona entre un diámetro de 1,0 cm, 1,5 cm, 2,0 cm y 2,5 cm.
- 15 19. Un procedimiento como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que adicionalmente comprende el envío o el transporte de dicho equivalente epidérmico o complejo de piel mediante:
- g) la separación de dicho equivalente epidérmico o complejo de piel de dicho medio de cultivo,
 - h) la transferencia de dicho equivalente a un transportador y
 - i) la puesta en contacto de dicho equivalente epidérmico y el transportador con un medio solidificado o
- 20 gelificado.
20. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 19, en el que dicho equivalente está revestida en su parte superior o en su lado cornificado con una membrana transportadora.
21. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 20, en el que dicho equivalente se precinta adicionalmente y se envía para emplearlo en el futuro para realizar injertos.
- 25 22. Un procedimiento como se reivindica en la reivindicación 19, en el que dicho medio solidificado o gelificado se selecciona entre agarosa, metil celulosa y otra sustancia gelificante.