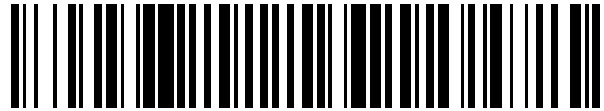


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 576**

51 Int. Cl.:

A61K 35/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2005 E 05857375 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1799235**

54 Título: **Composiciones de proteínas de células cutáneas fetales para el tratamiento de afecciones, trastornos o enfermedades de la piel y métodos para prepararlas y usarlas**

30 Prioridad:

15.09.2004 US 610613 P
03.01.2005 US 641067 P
14.09.2005 US 226558

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2013

73 Titular/es:

NEOGYN, INC (100.0%)
101 West Big Beaver Road, Suite 845, Columbia
Center II
Troy, MI 48084 , US

72 Inventor/es:

LAURENT-APPEGATE, LEO y
HOHLFELD, PATRICK

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 400 576 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 de proteínas de células cutáneas fetales para el tratamiento de afecciones, trastornos o enfermedades de la piel y métodos para prepararlas y usarlas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a composiciones para usar en el tratamiento de la vulvodinia. Las composiciones contienen proteínas de células cutáneas fetales obtenidas de células fibroblastos fetales humanas después de lisis celular inducida, en las que las células fibroblastos fetales humanas se han obtenido a las 12-16 semanas de gestación.

Antecedentes de la invención

- 10 Hasta una determinada edad gestacional, la piel fetal cura sin formación de cicatriz o solo con cicatriz muy pequeña (llamado también reparación sin cicatriz o curación sin cicatriz) después de herida (Dang C. et al., *Clin. Plast. Surg.* 2003: 30, 13-23), que indica una orquestación (regulación) óptima (equilibrada) de una respuesta celular coordinada en la piel fetal durante un periodo de tiempo de gestación específico. Sin embargo, la piel de los recién nacidos, jóvenes y adultos (que corresponde a piel no fetal) cura con formación de cicatrices después de sufrir una herida, lo
15 que indica que la respuesta celular coordinada en la piel no fetal es menos óptima o menos equilibrada que en la piel fetal.

- En animales grandes y seres humanos, la reparación sin cicatriz después de sufrir una herida se produce hasta mitad de gestación al principio del tercer trimestre. Alrededor de este periodo de tiempo, la curación de heridas fetales pasa de producirse sin cicatriz a la curación con formación de cicatriz tras herida de la piel fetal. En la piel, la
20 reparación sin cicatriz en el feto se caracteriza por la regeneración de una dermis organizada con apéndices normales (folículo piloso, glándula sebácea, glándula apocrina). Se cree que la curación sin cicatriz es, al menos en parte, el resultado de una falta relativa de inflamación, lo que corresponde a una respuesta pro- y antiinflamatoria equilibrada (óptima) después de sufrir una herida.

- La capacidad para curar sin formación de cicatriz parece que es intrínseca de la piel fetal y probablemente es el resultado de la interacción orquestada de muchas proteínas reguladoras incluyendo citoquinas. Esto se ilustra a continuación.

- Las heridas fetales sin cicatriz curan con poca inflamación, y el inicio de la cicatrización durante la reparación fetal se correlaciona con la presencia de un infiltrado inflamatorio agudo (G. P. Yang et al. *Wound Rep. Reg.* 2003; 11: 411-418). Además, la introducción de inflamación en heridas que normalmente curan sin cicatriz produce un aumento de
30 la deposición de colágeno y cicatrización. Esto sugiere una función importante de la inflamación durante la formación de cicatriz. Cuando el sistema inmunitario se desarrolla y aumenta su respuesta inflamatoria resultante, se produce la formación de cicatriz en el sitio de la reparación. La síntesis y remodelado de la matriz extracelular (ECM) por los fibroblastos de la herida es probablemente el determinante principal de la arquitectura dérmica después de reparación. Las diferencias entre la cicatrización y la arquitectura de colágeno sin cicatriz se pueden explicar
35 parcialmente por diferencias fenotípicas entre los fibroblastos adultos y fetales.

- Los fibroblastos fetales y adultos presentan diferencias en las tasas sintéticas de colágeno, ácido hialurónico (HA) y otros componentes de la ECM. In vitro, los fibroblastos fetales sintetizan más colágeno de tipo III y IV que sus homólogos adultos. Los fibroblastos fetales pueden proliferar (o multiplicarse) y sintetizar colágeno simultáneamente. Los fibroblastos fetales tienen una mayor capacidad para migrar en los geles de colágeno que los fibroblastos de
40 adultos. El aumento de la densidad celular disminuye la producción de HA en el adulto, pero no afecta a la síntesis de HA de los fibroblastos fetales.

- Las isoformas del factor de crecimiento transformante (TGF) TGF-beta 1 y TGF-beta 2 (ambas isoformas son factores de crecimiento; los factores de crecimiento pertenecen a la familia de las proteínas citoquinas) tienen funciones profibróticas (inducen fibrosis) y promueven la formación de cicatriz. Su expresión es mayor en la curación
45 de heridas normal, y la administración exógena de este factor de crecimiento a las heridas de adultos aumenta la acumulación de colágeno, proteoglicanos y células inflamatorias. El TGF-beta-1 también disminuye las metaloproteasas de la matriz y aumenta los inhibidores endógenos de la expresión de metaloproteasas de la matriz, lo cual puede favorecer la acumulación de colágeno y cicatrización. Además, el tratamiento de heridas en ratas adultas con anticuerpos neutralizantes contra TGF-beta 1 y TGF-beta 2 reduce la formación de cicatriz. También se
50 ha descrito que el tratamiento con fibromodulina, un modulador de TGF-beta reduce la cicatrización postnatal.

- Además, parece que la proporción relativa de isoformas de TGF-beta y no la cantidad absoluta de una cualquiera de las isoformas, determina el resultado de la reparación de la herida. En las heridas fetales sin cicatriz, la expresión del TGF-beta 3 (isoforma de TGF-beta) es mayor, mientras que la expresión de TGF-beta-1 no cambia. A la inversa, la expresión de TGF-beta-1 es mayor y la de TGF-beta 3 es menor en las heridas fetales que cicatrizan. El tratamiento
55 de heridas en ratas adultas con TGF-beta 3 exógeno reduce la formación de cicatriz. Estos datos sugieren que la relación de TGF-beta 3 a TGF-beta 1 puede determinar si la arquitectura de la piel se restablece o forma cicatriz después de la herida.

Las interleuquinas (pertenecientes a la familia de proteínas citoquinas) regulan la quimiotaxia y activación de las células inflamatorias. La interleuquina-6 (IL-6) estimula la quimiotaxia de monocitos y la activación de macrófagos mientras que la interleuquina-8 (IL-8) atrae neutrófilos y estimula la neovascularización. La herida estimula un aumento rápido de IL-6 e IL-8, que persiste en el adulto pero desaparece rápidamente en el feto. El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, factor de crecimiento que pertenece a la familia de proteínas citoquinas) induce la producción de IL-6 de los fibroblastos de adulto. A su vez, la adición de IL-6 a heridas fetales produce la cicatrización temprana. En los fibroblastos fetales, comparados con los de adultos, la expresión de IL-6 e IL-8 de los fibroblastos es más baja en el valor inicial y después de estimulación con PDGF. La interleuquina-10 (IL-10) tiene una función antiinflamatoria al disminuir la producción de IL-6 e IL-8. Por ejemplo, se ha mostrado en el ratón adulto, que las heridas tratadas con un vector adenovírico que expresa en exceso IL-10 presentan menor inflamación y curación sin cicatriz.

El PDGF y la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) son citoquinas profibróticas adicionales. El PDGF, un mitógeno potente y quimioattractor para fibroblastos, tiene una expresión prolongada durante la formación de cicatriz, pero desaparece rápidamente en las heridas fetales. Por ejemplo, se ha mostrado que el tratamiento de heridas en conejos fetales con PDGF induce un notable aumento de la inflamación aguda, reclutamiento de fibroblastos, y deposición de colágeno. La familia de FGF de citoquinas, incluyendo el factor de crecimiento de queratinocitos-1 y 2 (factores de crecimiento que pertenecen a la familia de proteínas citoquinas) tiene una mayor expresión con el aumento de la edad gestacional en la piel fetal y durante la formación de heridas en el adulto.

En cambio, un mitógeno para células endoteliales, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, factor de crecimiento que pertenece a la familia de proteínas citoquinas), aumenta al doble en heridas sin cicatriz, mientras que su expresión no cambia en heridas fetales que cicatrizan. Por lo tanto, un mayor estímulo de la angiogénesis y la permeabilidad vascular puede ayudar a la rápida curación de las heridas fetales.

Los mecanismos exactos de la curación sin cicatriz siguen siendo desconocidos, a pesar del gran aumento del conocimiento adquirido en la última década. La reparación de heridas fetales sin cicatriz es un procedimiento estrechamente regulado (orquestado) que implica diferentes mediadores celulares tales como citoquinas y otras proteínas.

Las terapias actuales no proporcionan un mecanismo para la curación sin cicatriz. Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar composiciones y métodos para usar las composiciones descritas para tratar sujetos que padecen una afección, trastorno o enfermedad de la piel, y que necesiten una curación sin cicatriz y/o necesiten una respuesta equilibrada para la inflamación cutánea.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición para usar en el tratamiento de la vulvodinia, que incluye una o más proteínas de células cutáneas fetales y un vehículo aceptable, donde las proteínas de células cutáneas fetales se obtienen de una o más células fibroblastos fetales humanas después de lisis celular, en la que las células fibroblastos fetales se obtienen a las 12-16 semanas de gestación. Las células fibroblastos fetales se obtienen del tejido cutáneo fetal entero o fragmentos de tejido cutáneo fetal. Las células fibroblastos fetales se pueden inmortalizar. Las células fibroblastos fetales se pueden obtener de un banco de células o una línea celular.

Las proteínas de células cutáneas fetales se pueden purificar o pueden incluir uno o más componentes celulares. Las proteínas de células cutáneas fetales incluyen citoquinas, enzimas, hormonas, proteínas estructurales de la matriz extracelular, neuropéptidos o antagonistas de neuropéptidos. Las citoquinas pueden incluir factores de crecimiento, interleuquinas, linfoquinas, monoquinas, interferones, factores estimuladores de colonias o quimioquinas o combinaciones y mezclas de los mismos. Las proteínas de células cutáneas fetales se pueden incorporar en la composición en una concentración entre 0,001% y 95%. Más preferiblemente, se pueden incorporar en la composición en una concentración entre 0,01% y 5%. Lo más preferiblemente, se pueden incorporar en dicha composición en una concentración entre 0,05% y 0,25%.

La composición puede incluir además analgésicos, anestésicos, agentes antiinflamatorios, agentes antihistamínicos, antioxidantes, antiirritantes, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, conservantes, agentes estabilizantes de proteínas, inhibidores de proteasa, agentes protectores de la piel, filtros solares o combinaciones y mezclas de los mismos.

La composición es adecuada para la administración tópica, en mucosa, ocular, rectal o vaginal. Preferiblemente, la composición es adecuada para la administración tópica.

La composición puede ser una pomada, loción, crema, espuma, mousse, pulverizador, aerosol, emulsión, nanoemulsión, microemulsión, máscara, gel, hidrogel, disolución, esponja o dispersión, adecuados para aplicaciones farmacéuticas o cosméticas. La composición puede ser una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua o una crema basada en una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua.

La lisis celular es inducida y no es espontánea. La lisis celular se puede llevar a cabo de forma mecánica, física o química. Preferiblemente, la lisis celular se lleva a cabo mediante uno o más ciclos de congelación-descongelación. La lisis celular se puede llevar a cabo con entre 100 y 60.000.000 células cutáneas fetales suspendidas en 1 mililitro de un sistema acuoso. Más preferiblemente, la lisis celular se lleva a cabo con entre 10.000.000 y 20.000.000 células cutáneas fetales. El sistema acuoso puede ser un sistema de tampón fisiológico. Más preferiblemente, el sistema acuoso es un sistema de disolución salina tamponada con fosfato. El sistema acuoso puede incluir además uno o más compuestos químicos estabilizantes de proteínas, inhibidores de proteasa, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antioxidantes, conservantes o combinaciones y mezclas de los mismos.

Preferiblemente, la vulvodinia puede ser el síndrome de vestibulitis vulvar o liquen escleroso vulvar. El tratamiento puede incluir además el uso de corticosteroides, estrógeno, progesterona, lidocaína, capsaicina, isotretinoína, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , dapsona, aciclovir, antidepresivos tricíclicos o combinaciones o mezclas posibles de los mismos.

Preferiblemente, el sujeto que necesita el tratamiento por los métodos es un animal. Preferiblemente, el animal es un caballo. Más preferiblemente, el sujeto es un humano.

15 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra la eficacia de la crema 1 que contiene proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, en el tratamiento del síndrome de vestibulitis vulvar, evaluada por una entrevista sobre la calidad de la vida sexual.

La figura 2 es una gráfica que muestra la eficacia de la crema 2 que contiene proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, en el tratamiento del síndrome de vestibulitis vulvar, evaluada por una entrevista sobre la calidad de la vida sexual.

La figura 3 es una gráfica que muestra la eficacia de la crema 2 que contiene proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, en el tratamiento del síndrome de vestibulitis vulvar, evaluada por la medición del umbral de dolor vulvar antes y después de tratamiento. El umbral de dolor se da en miliNewton (mN); se dan la media y la desviación típica (n=6).

La figura 4 es una gráfica que muestra la eficacia de la crema 1 que contiene proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, en el tratamiento de eczema de la mano. Se usó el siguiente sistema de puntuación: 0 = no están presentes, 1 = leves, 2 = moderados, 3 = graves, y 4 = muy graves, para evaluar los síntomas antes (curva en negro) y después (curva en rojo) del tratamiento. Se dan los valores medios; n = 5.

La figura 5 es una fotografía que muestra la eficacia de la crema 1 que contiene proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, en el tratamiento de la psoriasis. Se muestra un ejemplo representativo de un paciente con psoriasis antes y después de usar la crema durante varias semanas.

La figura 6 es una fotografía que muestra la eficacia de la crema 2 que contiene proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, en el tratamiento de la rosácea en combinación con un producto de alfa-hidroxiácido (ácido glicólico). Se muestra un ejemplo representativo de un paciente con rosácea antes y después de usar la crema durante dos semanas.

La figura 7 es una fotografía que muestra la eficacia de la crema 2 que contiene proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, en el tratamiento de la rosácea con dermatitis seborreica concomitante en combinación con medicación para rosácea (producto de ácido azelaico). Se muestra un ejemplo representativo de un paciente con rosácea con dermatitis seborreica concomitante antes y después de usar la crema durante 7 semanas.

La figura 8 es una fotografía que muestra la eficacia de la crema 2 como tratamiento después de heridas y/o lesiones cutáneas menores producidas después de criocirugía. Se llevó a cabo criocirugía (o crioterapia) para eliminar manchas de edad en las manos. Se muestran las imágenes después de criocirugía (la foto Antes, corresponde a antes del uso de la crema) y después del uso de la crema dos veces al día durante 6 semanas (Después).

La figura 9, es una fotografía que muestra la eficacia de la crema 2 en la mejora del aspecto de las líneas finas y arrugas de la piel, incluyendo el pliegue nasolabial en una mujer de 54 años: antes (imagen de la izquierda) y después de aplicación dos veces al día durante 6 semanas (derecha).

Descripción detallada de la invención

Diferentes estudios indican que numerosas afecciones, trastornos y/o enfermedades de la piel tienen a menudo causas con múltiples factores, a menudo con activación de rutas inmunológicas e inflamatorias complejas. Por ejemplo, existe una amplia red de citoquinas que orquestan el desarrollo de los mecanismos relacionados con la enfermedad en las afecciones, trastornos y/o enfermedades de la piel inflamatorias, neurogénicas y/o neuroinflamatorias. La regulación de las respuestas celulares coordinadas durante la regeneración cutánea,

reparación cutánea o curación de heridas, requiere además la interacción de muchas citoquinas (*Physiol. Rev.* 83: 2003, 835-870).

5 Por lo tanto se puede especular que numerosas afecciones, trastornos o enfermedades de la piel inflamatorias, neurogénicas y/o neuroinflamatorias se pueden tratar más satisfactoriamente mediante la combinación de principios activos específicos y/o por combinación de regímenes de tratamiento específicos.

10 Hoy en día, la mayoría de las afecciones, trastornos y/o enfermedades de la piel inflamatorias, neurogénicas y/o neuroinflamatorias se tratan con un solo agente activo. Raramente se combinan dos o hasta tres agentes activos en el mismo fármaco para obtener una actividad y eficacia del fármaco potenciadas, sinérgicas o complementarias. Como ejemplo, se da la combinación de dos fármacos analgésicos externos tales como la hidrocortisona y el hidrocloruro de pramoxina en la misma formulación. En otro ejemplo, una terapia de combinación para la psoriasis, usando corticosteroides tópicos (dipropionato de betametasona y diflucortolona, respectivamente) junto con ácido salicílico produjo una mayor eficacia (*Am. J. Clin. Dermatol.* 5, 2004, 71-77). Con respecto a las aplicaciones tópicas, los expertos en la técnica conocen otros ejemplos similares. Estos ejemplos representan fármacos que combinan dos o más compuestos químicos sintéticos como entidades farmacológicas activas en la misma composición. Las composiciones biofarmacéuticas similares que combinan dos o más proteínas activas son menos frecuentes. Por ejemplo, actualmente no está comercializado dicho producto biofarmacéutico disponible en el comercio.

20 La lisis celular inducida (rotura celular inducida) de las células cutáneas fetales, que se obtienen en una edad gestacional en la que la piel fetal cura sin o con poca formación de cicatriz después de sufrir una herida, proporciona proteínas de células cutáneas fetales para una orquestación (regulación) equilibrada (óptima) de la inflamación cutánea, regeneración cutánea y reparación cutánea. Inducido se define como planeado, pretendido, diseñado y/o predeterminado por seres humanos y/o el hombre. Inducido se define además como lo opuesto a espontáneo o que ocurre de forma natural en la naturaleza. La lisis celular inducida por el hombre se define además como que no es apoptosis (muerte celular programada) ni es necrosis (muerte celular no programada) debido a cambios en las condiciones de cultivo de las células.

25 La lisis celular inducida se puede lograr por métodos mecánicos, físicos y/o químicos. Por ejemplo, uno o más ciclos de congelación-descongelación son un ejemplo de una lisis celular inducida.

30 La lisis celular inducida permite obtener proteínas en una sola etapa en un momento específico y definido del estado celular (p. ej., número de pase, viabilidad, ciclo celular, nivel de confluencia, etc.). Como resultado, la lisis celular inducida permite obtener una mezcla de proteínas de una composición de proteínas específica (corresponde a una mezcla de proteínas óptima naturalmente equilibrada) presente en el momento de la lisis celular. Esta composición es diferente de cuando se incorporan células viables en una composición, donde las proteínas son liberadas (expulsadas por las células por exocitosis) y/o producidas de otra forma por la célula a lo largo del tiempo y/o durante y después de apoptosis o necrosis. Además, la lisis celular inducida permite obtener: (1) proteínas que normalmente no son liberadas por la célula, (2) proteínas que no son modificadas durante el proceso de liberación o exocitosis, (2) proteínas con diferentes grados de modificaciones postraduccionales (las modificaciones postraduccionales pueden implicar la formación de enlaces disulfuro y/o la unión de cualquiera de una serie de grupos funcionales bioquímicos, tales como acetato, fosfato, diferentes lípidos e hidratos de carbono. Las enzimas también pueden eliminar uno o más aminoácidos del extremo amino de la cadena de polipéptido, o cortar el polipéptido en la cadena), y/o (3) proteínas en proforma (p. ej., precursor inactivo de proteína activa). Las proteínas en la proforma a menudo son más estables que la proteína final (activa). Las proteínas en la proforma se puede activar mediante enzimas (p. ej., hidrolasas) en la composición y/o una vez que alcanzan el tejido diana y/o la célula diana (p. ej., piel, células cutáneas). Además, la lisis celular inducida permite obtener proteínas en su entorno natural, entorno de tipo celular, pero exentas de una pared celular, lo que ayuda a la estabilización adicional (previene la degradación, hidrólisis, cambios conformaciones y/o desnaturalización) de las proteínas. Otra ventaja de inducir la lisis celular es el hecho de que las proteínas así obtenidas no contienen, o contienen una cantidad menor, de proteínas normalmente liberadas/producidas por células estresadas. Esto puede ocurrir en una composición que contiene células. En general, las células en composiciones celulares se convierten en estresadas debido a la falta de nutrientes celulares, cambios de pH, cambios de temperatura, estrés oxidativo y/o otros factores ambientales, físicos y químicos que influyen en el crecimiento y/o la viabilidad de las células durante la administración de la composición.

50 Algunas proteínas producidas por dichas células estresadas son de naturaleza proinflamatoria, no tienen o tienen solo poca eficacia clínica y/o pueden ser perjudiciales de otra forma.

La solicitud de patente de EE.UU. 2003/0175256 se da en la presente memoria como un ejemplo representativo de composiciones celulares. Las composiciones incluyen células cutáneas fetales indiferenciadas que son integradas con una matriz de colágeno o un vehículo.

55 En una de las realizaciones preferidas, la lisis celular es inducida por congelación/descongelación o congelación-descongelación. La técnica implica congelar (p. ej. en nitrógeno líquido, en un baño de hielo seco y alcohol, etc.) las células cutáneas fetales y/o una suspensión de células cutáneas fetales y después descongelar el material a temperatura ambiente y/o 37°C. Este método de lisis celular inducida hace que las células se hinchen y finalmente se rompan al formarse cristales de hielo durante el proceso de congelación y finalmente se contraen durante la descongelación. En general, son necesarios múltiples ciclos de congelación-descongelación para la

lisis eficaz. Se ha mostrado que la congelación/descongelación libera eficazmente las proteínas localizadas en la célula.

5 Dichas proteínas obtenidas después de dicha lisis celular inducida comprenden una mezcla de una o más proteínas y pueden contener o no otros constituyentes de células cutáneas tales como lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y/o otras biomoléculas. Una biomolécula es un compuesto químico que se encuentra de forma natural en organismos vivos y células. Las biomoléculas consisten principalmente en carbono (C), e hidrógeno (H), junto con nitrógeno (N), oxígeno (O), fósforo (P) y azufre (S). Además de estos elementos (C, H, N, O, P y S), a veces se incorporan otros elementos, pero estos son menos habituales. Los lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos son ejemplos de biomoléculas.

10 Las proteínas son polímeros de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos; las proteínas pueden estar compuestas de una, dos o más cadenas de polipéptidos. Las proteínas pueden ser de diferentes tipos de proteínas (p. ej., proteínas solubles en agua, proteínas unidas a membrana, proteínas de superficie celular, proteínas estructurales, proteínas homólogas, etc.) y/o de diferentes clases de enzimas (oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y/o ligasas) y pueden estar glicosiladas en diferentes grados. Las proteínas también se pueden llamar
15 péptidos y/o polipéptidos.

Dicha lisis celular inducida permite obtener dichas proteínas como una mezcla fisiológica, natural u óptima (o naturalmente equilibrada) de proteínas presentes en la célula en el momento de la lisis celular inducida. A diferencia de obtener dichas proteínas por la lisis celular inducida definida antes, la incorporación de células viables en una composición para el tratamiento de afecciones, trastornos o enfermedades de la piel no permite obtener dichas
20 proteínas. Las proteínas obtenidas cuando las células viables se incorporan en una composición son de diferentes características (p. ej., estructura de proteína, composición de proteínas, presencia de citoquinas, estabilidad, etc.) y/o actividad (p. ej., estimulación de proliferación, propiedades antiinflamatorias, etc.) que las proteínas obtenidas por lisis celular inducida.

Las células viables son células que tienen una viabilidad celular que se puede medir. La viabilidad celular se puede
25 medir usando una variedad de ensayos de viabilidad celular incluyendo, pero sin limitar, la medición de la actividad metabólica (p. ej., ensayo de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio], ensayo de ATP [trifosfato de adenosina]), supervivencia y crecimiento en cultivo celular (p. ej., ensayo de proliferación), ensayo funcional, incorporación de metabolito (p. ej., ensayos basados en fluorescencia), alteración estructural e integridad de membrana (p. ej., ensayo de LDH (lactato deshidrogenasa)). Cada método de ensayo de viabilidad se basa en
30 diferentes definiciones de viabilidad celular.

Además, dichas proteínas de células cutáneas fetales obtenidas después de dicha lisis celular inducida, se pueden manipular, separar, purificar, concentrar, modificar, fraccionar, estabilizar y almacenar. Además, las proteínas de células cutáneas fetales se pueden integrar en diferentes vehículos (formas de suministro, formas de liberación, formulaciones, dispositivos) con o sin modificaciones. En una de las realizaciones preferidas de esta invención,
35 dicho vehículo es una preparación tópica adecuada para aplicaciones farmacéuticas y/o cosméticas. Una preparación tópica adecuada contiene ingredientes adecuados (para el experto en la técnica) para aplicaciones cosméticas y/o farmacéuticas y se prepara usando métodos de preparación adecuados (para el experto en la técnica). Dicha preparación tópica se aplica a las superficies corporales tales como la piel, cuero cabelludo y/o membranas mucosas. Las membranas mucosas son revestimientos de origen ectodérmico, cubiertas de epitelio, y
40 están implicadas en la absorción y secreción. Revisten diferentes cavidades corporales que están expuestas al entorno exterior y órganos internos. En varios sitios es continua con la piel: en las fosas nasales, los labios, los oídos, la zona genital incluyendo el pene, vulva y vagina y el ano.

Las composiciones diseñadas para usar en el tratamiento de un sujeto que padece vulvodinia comprenden una o más proteínas de células cutáneas fetales obtenidas de una o más células cutáneas fetales por lisis celular inducida.
45 Dichas células cutáneas fetales son de origen humano. Se obtienen de una o más muestras de tejido cutáneo fetal y/o fragmentos de tejido cutáneo fetal a las 12-16 semanas de gestación, cuando el tejido cutáneo está presente durante el desarrollo del feto. En una realización preferida de esta invención, el tejido cutáneo fetal, las muestras de tejido cutáneo fetal y/o los fragmentos de tejido cutáneo fetal para producir dichas células cutáneas fetales se obtienen a una edad gestacional en la que la piel fetal muestra curación de heridas sin o con formación mínima de cicatriz después de cirugía dentro del útero.
50

La invención describe el uso de dicho tejido cutáneo fetal desde media gestación al principio del tercer trimestre, con el fin de obtener dichas proteínas de células cutáneas fetales, en la que dicho tejido cutáneo fetal se obtiene (separado por cirugía, obtenido por biopsia o una muestra de otra forma) de las 12-16 semanas de gestación de un feto humano.

55 Dichas células cutáneas fetales se obtienen como una parte o como el tejido cutáneo entero mediante toma de muestra del tejido cutáneo, toma de una biopsia de piel, o recolección de tejido cutáneo. Las células cutáneas fetales se pueden obtener por crecimiento a partir de tejido cutáneo fetal, fragmentos de tejido y/o muestras de tejido puestas en placas de cultivo en condiciones de cultivo adecuadas usando técnicas de cultivo celular convencionales. Se pueden obtener cultivos de células cutáneas fetales o líneas celulares cutáneas fetales, a partir de los cuales se

5 pueden establecer bancos de células y/o líneas celulares. Las células cutáneas fetales se pueden cultivar y expandir (crecer, multiplicar) hasta un número de pases alto y/o hasta un número alto de divisiones celulares. Las células cutáneas fetales se cultivan y expanden preferiblemente hasta un número de pases y/o hasta un número de divisiones en el que las características celulares, en particular el perfil de expresión de genes y/o proteínas de las células, son similares o comparables a las características celulares de las células obtenidas a partir del tejido cutáneo fetal. A menudo, las células cutáneas fetales se cultivan y expanden hasta un número bajo de pases y/o divisiones celulares.

Las células cutáneas fetales pueden estar en cualquier estado de diferenciación o proliferación. Pueden ser indiferenciadas o diferenciadas. Las células cutáneas fetales comprenden fibroblastos.

10 Los fibroblastos fetales se definen como células procedentes u obtenidas de piel fetal, que se pueden cultivar y desarrollar (proliferar) en condiciones de cultivo celular (p. ej., medio) iguales o similares a las usadas habitualmente por el experto en la técnica para los fibroblastos dérmicos de adulto.

15 Opcionalmente, las células cutáneas fetales o líneas celulares cutáneas fetales se pueden someter a inactivación mitótica antes de usar. La inactivación mitótica se puede realizar por irradiación gamma, inhibidores mitóticos y/o mediante incubación con mitomicina.

20 Opcionalmente, las células cutáneas fetales se pueden inmortalizar y/o transfectar con un gen. Las células cutáneas fetales continuas o inmortalizadas se pueden obtener de tejido cutáneo fetal. Las células cutáneas fetales continuas o inmortalizadas incluyen, pero sin limitar, fibroblastos cutáneos fetales inmortalizados, y/o queratinocitos cutáneos fetales inmortalizados, y/o melanocitos fetales inmortalizados. Se obtienen de tejido cutáneo fetal de origen humano y/o animal. Dichas células cutáneas fetales continuas o inmortalizadas se diseñan para mantener el potencial de diferenciación de las células cutáneas fetales primarias (no inmortalizadas o no continuas) y/o expresar proteínas de diferenciación características de fibroblastos cutáneos fetales primarios, incluso después de un número alto de pases. Más específicamente, un objeto de la invención es obtener células cutáneas fetales continuas (o líneas celulares cutáneas fetales continuas), que mantienen la capacidad de producir (expresar, sintetizar) proteínas implicadas en procesos relacionados con la antiinflamación y/o proteínas implicadas en la orquestación (regulación) de la regeneración cutánea, reparación cutánea y/o curación de heridas, incluso después de un número alto de pases.

30 La una o más proteínas de células cutáneas fetales se obtienen de una o más células fibroblastos fetales mediante dicha lisis celular inducida (rotura celular). Las proteínas de células cutáneas fetales pueden estar compuestas predominantemente de proteínas (>75% del peso seco) o pueden incluir otras biomoléculas y/o componentes orgánicos y/o inorgánicos derivados de células, incluyendo, pero sin limitar, aminoácidos, componentes de la matriz extracelular (p. ej., ácido hialurónico), ADN, ARN, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, lípidos, azúcares, monosacáridos, polisacáridos, minerales, agua, sales, así como cualquier otro material extra o intracelular. Las proteínas de células cutáneas fetales se pueden usar con o sin procesamiento y/o manipulación adicional. Por ejemplo, las proteínas de células cutáneas fetales se pueden usar después de una o varias etapas de purificación y/o separación. Por ejemplo, las proteínas de células cutáneas fetales que no contienen, contienen poco o menos ARN y/o ADN se puede obtener eliminando o eliminado parcialmente el ARN y/o ADN mediante etapas adecuadas de manipulación, separación y/o purificación. Igualmente, se pueden incluir una o más etapas de manipulación, purificación y/o separación después de la lisis celular inducida, con el fin de obtener una proteína única y específica con una alta concentración o pureza. Igualmente, se pueden incluir una o más etapas de manipulación, purificación y/o separación después de lisis celular inducida, con el fin de obtener una mezcla de proteínas definida, que comprende dos o más proteínas con una alta concentración o pureza.

35 En otro grupo de realizaciones de esta invención, las proteínas de células cutáneas fetales comprenden solo el líquido sobrenadante (líquido que contiene compuestos solubles que se deja atrás después de centrifugar una mezcla) obtenido después de centrifugación de dichas proteínas de células cutáneas fetales. En otras realizaciones de esta invención, las proteínas de células cutáneas fetales comprenden solo el sedimento celular (material celular que queda en el fondo del tubo de centrifugación) obtenido después de centrifugación de proteínas de células cutáneas fetales.

40 En una de las realizaciones preferidas de esta invención, las proteínas de células cutáneas fetales comprenden una mezcla naturalmente equilibrada de proteínas de células cutáneas fetales, que se obtienen después de la lisis celular inducida de células cutáneas fetales cultivadas en condiciones de cultivo celular convencionales (normales o comunes) para fibroblastos dérmicos de adulto (p. ej., usando medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con aproximadamente 10% de suero bovino fetal (FBS, llamado también suero de ternero fetal o FCS) en un incubador a 37°C, de 5% a 10% de CO₂ y >80% de humedad). Alternativamente, el uso de medio (o medios) de cultivo exentos de suero (no FCS o FBS) y/o medios de cultivo con contenido reducido de suero (p. ej. suero bovino fetal <10%), también se consideran condiciones de cultivo celular convencionales para fibroblastos dérmicos de adulto. La complementación (adición) de los medios de cultivo con antibióticos (p. ej., penicilina, estreptomina, etc.) también se considera condiciones de cultivo celular convencionales.

En otro grupo de realizaciones, las proteínas de células cutáneas fetales comprenden una mezcla de proteínas de células cutáneas fetales, que se obtienen después de la lisis celular inducida de células cutáneas fetales cultivadas

- en condiciones de cultivo no convencionales (anormales). Las condiciones de cultivo de células no estándar incluyen, pero sin limitar, cultivo de células bajo estrés oxidativo y/o químico, estrés físico y/o mecánico y/o temperaturas de cultivo elevadas o reducidas a lo largo de un periodo de tiempo limitado o prolongado. La complementación del medio de cultivo con compuestos químicos seleccionados y/o proteínas (p. ej., PDGF, etc.) para aumentar la producción de citoquinas específicas por las células cutáneas fetales también se consideran condiciones de cultivo de células no convencionales.
- En una de las realizaciones preferidas de esta invención, dichas proteínas de células cutáneas fetales comprenden citoquinas. Citoquina se refiere a un nombre genérico para un grupo diverso de proteínas y péptidos que actúan como reguladores, y que en condiciones normales o patológicas, modulan las actividades funcionales de células y tejidos individuales. Estas proteínas también median interacciones entre células directamente y regulan procesos que tienen lugar en el entorno extracelular.
- Como se expone en "The Cytokine Handbook" (4. ed., 2003, Academic Press, by Angus W. Thomson and Michael T. Lotze) y/o en la "Cytokines Online Pathfinder Encyclopedia" (<http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>) que se incorporan específicamente en la presente memoria por referencia, las citoquinas comprenden factores de crecimiento, interleuquinas, linfoquinas, monoquinas, interferones, factores estimuladores de colonias, quimioquinas y una variedad de otras proteínas.
- La mayoría de las citoquinas, pero no todas, son glicoproteínas. Muchos genes que codifican citoquinas pueden dar lugar a una variedad de formas variantes de citoquinas mediante corte y empalme alternativo, dando moléculas con bioactividades ligeramente diferentes pero biológicamente significativas. En muchos casos los patrones de expresión de diferentes de citoquinas o de miembros de una familia de citoquinas se solapan solo parcialmente, sugiriendo una función específica para cada factor. También se han descrito formas unidas a membrana para muchas citoquinas, y algunas pueden estar asociadas también con la matriz extracelular.
- La mayoría de las citoquinas son efectores pleótopos que muestran múltiples actividades biológicas. Además, múltiples citoquinas a menudo tienen actividades que se solapan y una sola célula con frecuencia interacciona con múltiples citoquinas con respuestas (interacción) aparentemente idénticas. Una de las consecuencias de este solapamiento funcional es la observación de que con frecuencia un factor puede sustituir funcionalmente a otro factor del todo o compensar al menos parcialmente la falta de otro factor. Puesto que la mayoría de las citoquinas tienen actividades biológicas ubicuas, su importancia biológica como reguladores normales de la fisiología a menudo es difícil de evaluar.
- Muchas citoquinas muestran actividades estimuladoras o inhibitorias y pueden tener sinergia (actuar de forma sinérgica) o antagonizar (actuar como antagonista) las acciones de otras citoquinas y/u otros factores. Una sola citoquina puede producir reacciones también en determinadas circunstancias que son las opuestas a las mostradas en otras circunstancias.
- En el tipo, la duración y también la extensión de las actividades celulares inducidas por una citoquina particular pueden influir considerablemente el microentorno de una célula, dependiendo, por ejemplo, del estado de crecimiento de las células (dispersas o confluentes), el tipo de células vecinas, concentraciones de citoquinas, la combinación de otras citoquinas presentes al mismo tiempo, e incluso la secuencia temporal de varias citoquinas que actúan en la misma célula. En dichas circunstancias, los efectos combinatorios permiten que una sola citoquina transmita diversas señales a diferentes subconjuntos de células.
- Las citoquinas son mediadores importantes implicados en la embriogénesis y desarrollo de órganos y sus actividades en estos procesos pueden diferir de los observados después del nacimiento. Además, tienen una función principal en los procesos neuroinmunológicos, neuroendocrinológicos y neuroreguladores. Las citoquinas son importantes reguladores positivos o negativos de la mitosis, diferenciación, migración, supervivencia celular y muerte celular, y transformación.
- Las actividades biológicas de las citoquinas son mediadas por receptores de membrana específicos que pueden ser expresados en prácticamente todos los tipos de células conocidos. Su expresión también está sujeta a varios mecanismos reguladores, aunque algunos receptores también son expresados de forma constitutiva. Se ha mostrado que las proteínas receptores de citoquinas comparten una serie de características. Muchos receptores son miembros de las familias de receptores de citoquinas. Muchos receptores son estructuras de múltiples subunidades que unen ligandos y al mismo tiempo tienen funciones como transductores de señales debido a su actividad intrínseca de tirosina quinasa. Muchos receptores a menudo comparten componentes receptores que transducen señales comunes en la misma familia, lo que explica, al menos en parte, la redundancia funcional de las citoquinas.
- Es la comunicación cruzada entre diferentes sistemas de señalización lo que finalmente permite la integración de una gran diversidad de estímulos, a los que puede estar sometida una célula en diferentes situaciones fisiológicas.
- Aunque ahora se usan en clínica algunas citoquinas recombinantes y se han hecho intentos de desarrollar moléculas híbridas a partir de citoquinas conocidas que tienen la ventaja de los respectivos factores, pero no sus desventajas, hay que ser consciente del hecho de que el conocimiento actual todavía es limitado. Las citoquinas son poderosas "armas" de doble filo que pueden desencadenar una cascada de reacciones, y pueden mostrar

actividades que a menudo van más allá de una sola propiedad muy específica que se espera que tengan. Se descubren constantemente nuevos factores y extienden el conocimiento sobre la red de citoquinas.

5 Entre el grupo de citoquinas están las interleuquinas así como los factores de crecimiento y estimuladores de colonias. La interleuquina es el nombre genérico de un grupo de citoquinas bien caracterizadas que son producidas por leucocitos y otros tipos de células incluyendo células cutáneas. Tienen un amplio espectro de actividades funcionales que regulan las actividades y las capacidades de una amplia variedad de tipos de células, y son particularmente importantes como miembros de la red de citoquinas que regula las respuestas inflamatorias e inmunitarias. Los factores de crecimiento son proteínas que se unen a receptores de la superficie celular, con el resultado principal de activar la proliferación y/o diferenciación celular. Muchos factores de crecimiento son bastante versátiles, estimulando la división celular en numerosos tipos de células diferentes; mientras que otros son específicos de un tipo particular de célula.

10 Además, dichas proteínas de células cutáneas fetales pueden comprender enzimas de todas las clases de enzimas conocidas incluyendo, pero sin limitar oxidorreductasas (EC 1), transferasas (EC 2), hidrolasas (EC 3), liasas (EC 4), isomerasas (EC 5) y ligasas (EC 6) como se publica en *Enzyme Nomenclature* 1992 (Academic Press, San Diego, California) y sus complementos.

15 Dichas oxidorreductasas pueden incluir, pero sin limitar, oxidorreductasas que actúan en un peróxido como aceptor (subclase EC 1.11; incluyendo peroxidasas (EC 1.11.1) tales como catalasa y/o glutatión peroxidasa), y/u oxidorreductasas que actúan en radicales superóxido como aceptores (subclase EC 1.15; incluyendo superóxido dismutasa (SOD) y/o superóxido reductasa).

20 Dichas proteínas de células cutáneas fetales también pueden comprender péptidos y/o proteínas incluyendo, pero sin limitar, hormonas, neuropéptidos, neurohormonas y/o sus respectivos antagonistas receptores.

25 En otra realización de esta invención, las proteínas de células cutáneas fetales comprenden proteínas contenidas en el medio de cultivo condicionado de una o más de dichas células cutáneas fetales. El medio de cultivo condicionado, es la disolución que contiene el medio de cultivo gastado (usado, agotado) y proteínas y otros componentes derivados de células liberados al medio de cultivo por las células durante el periodo de cultivo celular.

30 Dichas proteínas de células cutáneas fetales se pueden integrar (incorporar, incluir, mezclar, emulsionar, homogeneizar y/o añadir) en una variedad de composiciones. Una composición se forma integrando una o más proteínas de células cutáneas fetales en un vehículo, formulación o dispositivo adecuado para la aplicación tópica, en mucosa, ocular, rectal y/o vaginal, para obtener composiciones diseñadas para tratar a un sujeto que padece afecciones, trastornos o enfermedades de la piel. En una de las realizaciones preferidas, las proteínas de células cutáneas fetales se incorporan en una preparación tópica adecuada para aplicaciones farmacéuticas y/o cosméticas.

35 En otra realización de esta invención, el medio de cultivo condicionado obtenido después de cultivar dichas células cutáneas fetales se integra en un vehículo, formulación o dispositivo adecuado para la aplicación tópica, en mucosa, ocular, rectal y/o vaginal.

Dichas afecciones, trastornos o enfermedades de la piel tratadas con dichas composiciones no están limitadas a la vulvodinia que comprende vestibulitis vulvar y liquen escleroso vulvar.

Salvo que se indique lo contrario, los siguientes términos usados en la memoria descriptiva y reivindicaciones tienen los significados dados a continuación:

40 Los términos "tratado", "tratamiento" o "terapia" y similares, se refieren a cambios en el estado del sujeto receptor. Los cambios pueden ser subjetivos u objetivos y se pueden referir a aspectos tales como síntomas, signos o aspecto de la enfermedad o afección que se trata. Por ejemplo, si el paciente y/o el sujeto nota una irritación menor o menos dolor, entonces el tratamiento ha sido satisfactorio. Igualmente, si el médico nota cambios objetivos, tales como por análisis histológico de una muestra de biopsia, entonces el tratamiento también ha sido satisfactorio.

45 Alternativamente, el médico puede notar una disminución de las lesiones inflamatorias u otras anomalías tras el examen del paciente. Esto también representaría una mejora o un tratamiento satisfactorio. La prevención del deterioro del estado del receptor también está incluida en el término. El beneficio terapéutico incluye cualquiera de una serie de factores subjetivos u objetivos que indican una respuesta de la afección que se está tratando como se discute en el presente documento.

50 Las expresiones "fármaco", "agente farmacológico", "agente farmacéutico", "principio activo", "agente" y "agente activo" y similares, se usan de forma intercambiable y se pretende que tengan su interpretación más amplia como cualquier sustancia terapéuticamente activa que se suministre a un organismo vivo para producir un efecto deseado, normalmente beneficioso. En general, esto incluye agentes terapéuticos en todas las áreas terapéuticas principales, incluyendo también proteínas, péptidos, oligonucleótidos e hidratos de carbono, así como iones inorgánicos.

55 Afecciones, trastornos y/o enfermedades de la piel

Las composiciones para usar de acuerdo con la invención diseñadas para tratar la vulvodinia comprenden una o más proteínas de células cutáneas fetales obtenidas de una o más células cutáneas fetales por lisis celular inducida.

La composición se usa para tratar la vulvodinia, vestibulitis vulvar, liquen escleroso vulvar.

5 En los siguientes apartados se da una descripción breve, pero incompleta de las afecciones, trastornos o enfermedades de la piel. Se puede encontrar una información más detallada y constantemente actualizada sobre los síntomas, diagnóstico y tratamientos de las afecciones, trastornos o enfermedades de la piel en libros de texto convencionales sobre venerología, andrología, curación de heridas, dermatología y/o cosméticos tales como "Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine" (5ª edición; editado por I.M. Freedberg, A.Z. Eisen, K. Wolff, K.F. Austen, L.A. Goldsmith, S.I. Katz and T.B. Fitzpatrick) y "Textbook of Cosmetic Dermatology" (2ª edición; editado por R. Baran and H.I. Maibach)

Afecciones inflamatorias de la piel

15 Un gran número de afecciones, trastornos o enfermedades de la piel incluyendo, pero sin limitar, acné, dermatitis atópica, dermatitis alérgica de contacto, atrofia blanca, caspa, dermatitis, dermatitis de manos o eczema de manos, dermatitis herpetiforme, dermatitis del pañal, eczema, dermatitis exfoliativa generalizada, formación de queloide, prurito localizado o generalizado, fotodermatosis, peri-úlceras, psoriasis, quiste sebáceo, dermatitis seborreica, rosácea, vulvodinia, vestibulitis vulvar o síndrome de vestibulitis vulvar, liquen escleroso vulvar, están todas en la categoría de afecciones, trastornos o enfermedades de la piel inflamatorias, neurogénicas y/o neuroinflamatorias.

20 El síndrome de vestibulitis vulvar es uno de los subtipos más comunes de vulvodinia. Es una enfermedad femenina compleja que implica dolor limitado al vestíbulo vulvar sin signos clínicos objetivos para explicar los síntomas. La característica distintiva del síndrome de vestibulitis vulvar es el carácter del dolor localizado confinado al vestíbulo vulvar y su desencadenamiento en respuesta al tacto o presión. Respecto a esto, difiere de la vulvodinia disestésica, que implica dolor crónico, a menudo dolor vulvar no localizado que se produce con o sin estimulación.

25 Según Friedrich (*J. Reprod. Med.* 32, 1987, 110-114), los síntomas del SVV se localizan en el vestíbulo vulvar. Los criterios para reconocer el SVV incluyen: (1) dolor vestibular al tacto o por intento de entrada vaginal, (2) dolor en la palpación en respuesta a presión localizada dentro del vestíbulo vulvar; y (3) signos físicos confinados a eritema vestibular de diferentes grados (*J. Reprod. Med.* 32, 1987, 110-114). El eritema puede ser difuso o focal, y puede estar localizado alrededor de los orificios de las glándulas vestibulares o en la horquilla. Deben excluirse otras causas del eritema vestibular y el dolor en la palpación, tales como candidiasis (infecciones por levaduras) o infecciones por herpes (Smart and MacLean: *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 15, 2003, 497-500).

30 El SVV puede ser agudo o crónico, en el que lo más aceptado es un corte arbitrario de 6 meses para distinguir entre las dos formas. Las causas del SVV tienen múltiples factores. Se sospecha que son causas de la forma aguda las infecciones fúngicas o bacterianas (p. ej., cándida), irritantes químicos (p. ej., jabones), agentes terapéuticos (p. ej., antisépticos, supositorios, cremas), y reacciones alérgicas a fármacos. En la forma aguda el tratamiento de la causa supuesta puede conducir al alivio rápido.

35 La afección deteriora significativamente la función sexual y crea una ansiedad psicológica significativa. Además de dolor, el cual se describe como agudo, quemazón, o una sensación de ardor, otros síntomas incluyen picor, hinchamiento y abrasión. En casos graves, el dolor puede prohibir la relación sexual. Además, la inserción de tampón, montar en bicicleta o llevar pantalones ajustados también pueden provocar incomodidad. Por lo tanto, a menudo la morbosidad se puede extender más allá de los síntomas locales y muchas mujeres pueden experimentar disfunción sexual secundaria y a menudo reconocen depresión. Estos cambios pueden incluir profundos efectos negativos en los matrimonios.

El síndrome de vestibulitis vulvar ha sido revisado recientemente por Farage M.A. y Galask R.P. en *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* ("Vulvar vestibulitis syndrome: A review", May 28, 15 2005, Epub previo a versión impresa), que se incluye en la presente memoria como referencia.

45 La prevalencia del síndrome de vestibulitis vulvar en la población general no se conoce. La prevalencia era 15% entre las pacientes vistas a lo largo de un periodo de 6 meses en una clínica ginecológica (*Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1991, 98, 703-706). El único estudio basado en población disponible, que comprendía 4915 mujeres de 18 a 64 años de edad de comunidades de Boston étnicamente variadas (tasa de respuesta de 68%) encontró que aproximadamente 16% de las pacientes que respondieron referían historias de quemazón crónica, dolor punzante, o dolor por contacto que duraba al menos 3 meses o más (*J. Am. Med. Womens Assoc.* 2003, 58, 82-88). Aproximadamente 7% estaban padeciendo el problema en el momento del estudio. Aproximadamente 12% se quejaban específicamente de dolor por contacto vulvar. Además, el estudio encontró que aproximadamente 40% de las mujeres con dolor vulvar elegían no buscar tratamiento, y de las que lo hacían, 60% visitaba 3 o más médicos, muchos de los cuales no podían proporcionar un diagnóstico. Sin embargo, el estudio no distinguía claramente entre

55 la vestibulitis vulvar y la vulvodinia disestésica.

La etiología del síndrome de vestibulitis vulvar todavía no se ha establecido. Se ha asociado un desconcertante conjunto de variables con la afección, sugiriendo una patogénesis de múltiples factores (Farage MA and Galask RP).

La teoría que prevalece es que el síndrome de vestibulitis vulvar es un trastorno neuropático que implica percepción de dolor anormal que posiblemente resulta de la sensibilización de las fibras del nervio vestibular y el establecimiento de un bucle de síndrome simpático reflejo. En esta teoría, elementos desencadenantes no identificados, supuestamente alguna forma de inflamación crónica, activan y producen una activación prolongada de las fibras de tipo C del sistema nervioso simpático responsable de transmitir estímulos químicos nocivos al cerebro. Esto hace que las neuronas de amplio rango dinámico en el cerebro respondan de forma anormal, de modo que estímulos leves se perciben como dolor. Se ha sugerido que el procedimiento primero produce el dolor localizado del síndrome de vestibulitis vulvar y después evoluciona al dolor vulvar crónico generalizado de la vulvodinia disestésica.

Varios estudios apoyan la etiología neuropática para el síndrome de vestibulitis vulvar: el umbral para los estímulos térmicos y mecánicos es menor en las pacientes de vestibulitis vulvar (*Pain*. 2004, 107, 47-53), aunque líneas de pruebas recientes destacan una potencial disposición genética a la inflamación crónica entre las pacientes de vestibulitis vulvar. Las variantes proinflamatorias del gen del antagonista del receptor de interleuquina-1 polimórfico (*Am. J. Obstet.* 182: 2000, 283-285) y el gen del receptor de melanocortina-1 (*J. Reprod. Med.* 2004, 49, 503-509) son sustancialmente más prevalentes en las mujeres afectadas de vestibulitis vulvar. En concreto, se observó una notable menor inducción del antagonista del receptor de interleuquina-1 en la sangre de las pacientes con vestibulitis vulvar comparado con los controles sanos (*Am. J. Obstet. Gynecol.* 2002, 186, 696-700). Separadamente, una deficiencia en interferón α , no relacionada con los genotipos mencionados antes, puede contribuir a la inflamación vestibular crónica en un subconjunto de pacientes con vestibulitis vulvar, reduciendo su capacidad para combatir la infección intracelular (*Am. J. Obstet. Gynecol.* 2002, 186, 361-364).

Los posibles desencadenantes del síndrome de vestibulitis vulvar incluyen agentes infecciosos, uso excesivo de productos o medicamentos tópicos irritantes, antes de tratamientos con láser o criogénicos de infección por HPV, o hipersensibilidad al fluido seminal. Un factor que complica la identificación de estos desencadenantes es el retraso entre la primera aparición de los síntomas y el primer diagnóstico (Farage MA and Galask RP).

El SVV puede ser muy difícil de tratar debido a sus causas múltiples y con frecuencia desconocidas. Los pacientes a veces sufren durante un periodo de diagnóstico incorrecto, y pueden presentarse con un largo historial de intentos de terapia sin éxito. La terapia de primera línea para la vestibulitis vulvar es el tratamiento de sus supuestas causas. Esto incluye la interrupción del uso de agentes irritantes y terapéuticos, locales y sistémicos, que pueden contribuir al problema.

No existe una terapia curativa aceptada y los tratamientos actuales carecen de una base etiológica clara (Farage MA and Galask RP). Existen pocos ensayos clínicos prospectivos aleatorios rigurosos para la mayoría de las terapias; la prueba de su eficacia proviene en gran medida de estudios de casos individuales o series de casos. Los estudios también difieren en la definición de los criterios de éxito, incluyendo los criterios de valoración evaluados, la extensión de la recuperación y la duración del seguimiento.

Las intervenciones incluyen: alivio de los síntomas (anestésicos tópicos tales como lidocaína, antidepresivos tricíclicos en dosis baja y amitriptilina, gabapentina, etc.), bioautorregulación (bioautorregulación electromiográfica de la musculatura del suelo pélvico), tratamiento farmacológico de causas infecciosas putativas (fluconazol oral, interferón α o β inyectable, etc.), terapias psicosociales y de apoyo (comportamiento cognitivo, terapia sexual, etc.), cirugía para eliminar el tejido vestibular afectado (vestibuloplastia, vestibulectomía, perineoplastia), y combinaciones de los mismos.

No hay un tratamiento único que funcione en todos los pacientes. Además, muchos de esos planteamientos implican procedimientos médicos complejos, costes significativos, y/o efectos secundarios indeseables.

Son necesarios métodos mejorados para tratar la vestibulitis vulvar, en especial los casos de etiología desconocida y los casos que no responden al tratamiento de las supuestas causas.

El liquen escleroso es un trastorno de la piel inflamatorio crónico poco reconocido, que afecta principalmente a la zona vulvar y perineal (*Am. J. Clin. Dermatol.* 2004: 105-25). Aunque se considera una afección que afecta principalmente a mujeres maduras, hay mujeres de todas las edades con liquen escleroso. Los hombres pueden tener el trastorno y este afecta al pene y a veces a la zona anal. Los niños también pueden padecer liquen escleroso y a veces puede afectar a otras zonas del cuerpo. Cuando el liquen escleroso afecta a zonas del cuerpo distintas de los genitales, se conoce como "liquen escleroso extragenital". No se sabe lo que causa el liquen escleroso, pero se ha encontrado que hay una conexión entre el liquen escleroso y la enfermedad tiroidea, vitiligo y otras enfermedades autoinmunitarias.

Los diferentes síntomas son picor e irritación crónicos de la zona vulvar y dolor, fisuras en la piel vulvar, que producen picor y dolor, inflamación y a veces hinchamiento, grietas y sangrado de la piel alrededor de la abertura anal al pasar las deposiciones, que producen dolor y malestar, la piel se vuelve frágil y pálida y de aspecto blanco y hay una mayor susceptibilidad a la infección y estomatomicosis, "encogimiento" (atrofia) de la zona de la vulva, cambio en la forma y tamaño de la zona, que a veces produce dificultades para orinar y problemas sexuales, el liquen escleroso no se extiende a la vagina y/o en los hombres el prepucio se "funde" o se vuelve tirante haciendo que la retracción del prepucio sea dolorosa y puede ser difícil orinar.

El diagnóstico puede ser un proceso largo y difícil. Muchos médicos generales no son capaces de reconocer los síntomas y a veces se diagnostica incorrectamente a los pacientes y se tratan de “estomatomicosis”, ETS, menopausia o problemas hormonales. Normalmente es necesario el envío a un especialista y se toma una biopsia de piel para establecer la presencia de liquen escleroso y descartar cualquier posibilidad de tumor maligno.

5 En las mujeres, el liquen escleroso entra en la categoría general de vulvodinia.

La psoriasis es una enfermedad persistente de la piel que recibe su nombre de la palabra griega para “picor”. La piel se inflama produciendo zonas rojas, engrosadas, con escamas plateadas; con mayor frecuencia en el cuero cabelludo, codos, rodillas y la región lumbar. En algunos casos, la psoriasis es tan leve que la gente no sabe que la tiene. En el extremo opuesto, la psoriasis grave puede cubrir zonas grandes del cuerpo.

10 La causa de la psoriasis es desconocida. Sin embargo, descubrimientos recientes indican que es un trastorno crónico inflamatorio de la piel que es mediado por linfocitos T, células dendríticas y citoquinas inflamatorias (*Nat. Rev. Immunol.* 2005, 5: 699-711). Debido a la inflamación, la piel se descama demasiado rápido, cada tres a cuatro días. La persona a veces nota manchas nuevas de 10 a 14 días después de que la piel se corta, araña, roza, o tras quemadura solar grave. La psoriasis también puede activarse por infecciones, tales como faringitis, y por algunos medicamentos. A veces se producen agravamientos en invierno, como resultado de la piel seca y la falta de luz del sol.

15 La psoriasis aparece en muchas formas. Difieren en gravedad, duración, localización y en la forma y el patrón de las escamas. La forma más común empieza con pequeños bultos rojos y estas zonas se hacen gradualmente más grandes y forman escamas. Mientras que las escamas superiores se desprenden fácilmente y con frecuencia, las escamas debajo de la superficie se pegan entre sí. Cuando se eliminan, la piel tierna expuesta sangra. Estas zonas rojas pequeñas después crecen, haciéndose a veces bastante grandes. Las zonas afectadas más habitualmente por la psoriasis son los codos, rodillas, ingle y genitales, brazos, piernas, palmas y plantas de los pies, cuero cabelludo y cara, los pliegues del cuerpo y las uñas. A menudo aparece en el mismo sitio en ambos lados del cuerpo. Las uñas con psoriasis tienen diminutos hoyos en las mismas. Las uñas se pueden soltar, engrosar o astillarse y son difíciles de tratar. La psoriasis inversa se produce en la axila, bajo el pecho y en los pliegues de la piel alrededor de la ingle, nalgas y genitales. La psoriasis en gotas normalmente afecta a niños y adultos jóvenes. Aparece con frecuencia después de un dolor de garganta, con manchas escamosas, de tipo gotas, rojas y muy pequeñas que aparecen en la piel. Con frecuencia desaparece por sí misma en semanas o algunos meses. Hasta 30% de las personas con psoriasis pueden tener síntomas de artritis y 5-10% pueden tener alguna incapacidad funcional de la artritis de diferentes articulaciones. En algunas personas, la artritis es peor cuando está muy implicada la piel. A veces la artritis mejora cuando mejora la afección de la piel del paciente.

20 La rosácea es una enfermedad cutánea crónica común principalmente de la piel facial. Es común en la tercera y cuarta década de vida, con el máximo a los 40 y 50 años de edad. La fisiopatología de la rosácea parece que es inflamatoria, y la mayoría de las intervenciones modulan el proceso inflamatorio de alguna forma (*Cutis.* 2005, 75(3 Suppl): 27-32). Los agentes tópicos incluyen diferentes formulaciones de sulfacetamida de sodio y azufre, metronidazol, ácido azelaico, y peróxido de benzoilo/clindamicina. Los agentes orales incluyen antibióticos en dosis convencionales y subantimicrobianas. Un cambio de paradigma que se está produciendo en el tratamiento de la rosácea abarca el uso de estos y otros agentes sea solos o, cada vez más, en diferentes combinaciones, basándose en el subtipo de rosácea.

25 La fase inicial de la rosácea se caracteriza por el eritema persistente y telangiectasia, predominantemente en las mejillas, con frecuencia seguido de pápulas y papulopústulas. Más tarde, puede darse hiperplasia difusa del tejido conjuntivo y las glándulas sebáceas. Esto puede producir una hipertrofia de la nariz, denominada rinofima. La rosácea se desarrolla en etapas y puede afectar a los ojos, provocando frecuentemente blefaritis y conjuntivitis. Aparte de la cara, también pueden resultar afectadas otras zonas del cuerpo, como las áreas retroauriculares, cuello, pecho, espalda y cuero cabelludo. El aspecto clínico puede ser similar a la del acné, pero a diferencia de éste, la rosácea no es una enfermedad folicular primaria. En América se calcula que están afectados 14 millones de americanos. Debido a sus efectos de tipo cara roja y acné en el aspecto personal, puede producir problemas psicológicos, sociales y ocupacionales si se deja sin tratar.

30 La dermatitis representa una inflamación de la piel. La dermatitis se refiere realmente a una serie de afecciones de la piel que inflaman la piel. La dermatitis se caracteriza porque la piel puede estar roja, hinchada, con ampollas, costras, escamas, exudación o picazón. Algunos tipos de dermatitis son causadas por alergias, aunque la mayoría no tienen ninguna causa conocida. Hay muchos tipos de dermatitis que requieren cuidados clínicos por un médico u otro profesional de la salud.

35 La dermatitis atópica (eczema atópico o solo eczema) es un grupo heterogéneo de diferentes enfermedades de la piel no infecciosas, que pueden ser causadas por mecanismos irritativos así como inmunitarios, y conducir a cambios patológicos en la epidermis y dermis superior. Es la categoría más común de enfermedades de la piel. Los trastornos eczematosos también son con frecuencia enfermedades ocupacionales. El eczema es un grupo grande de signos clínicos, no una enfermedad particular, y puede ponerse de manifiesto con eritema, pápulas, vesículas, costras, exudación y edema en su fase aguda y con engrosamiento de la piel, liquenificación y descamación en su

5 fase crónica. El picor es un síntoma guía. Los términos “dermatitis” y “eczema” a menudo se usan de forma intercambiable, aunque algunos autores usan el término “dermatitis” para describir lesiones inflamatorias agudas y el término “eczema” más bien para lesiones epidérmicas crónicas con hiperqueratosis. Ambos términos se usan con frecuencia de forma sinónima, aunque se debe ser consciente del hecho de que el término “dermatitis” también se puede usar en enfermedades no eczematosas (tales como la dermatitis herpetiforme de Duhring).

La dermatitis de manos (eczema de manos) es común. Normalmente las erupciones de manos son resultado de una combinación de piel sensible e irritación, o una reacción alérgica a materiales que se han tocado. Las personas con dermatitis de manos a menudo tienen dermatitis en otra parte.

10 La dermatitis de contacto es una reacción fisiológica que se produce cuando la piel se pone en contacto con algunas sustancias. Aproximadamente el 80% de estas reacciones son causadas por productos irritantes para la piel. El 20% restante de las reacciones son causadas por alérgenos, que desencadenan una respuesta alérgica. En las reacciones alérgicas, la reacción puede no ser inmediata, si no que puede empezar después de varios días. La dermatitis de contacto causada por un producto irritante que no es una respuesta alérgica se produce por el contacto directo con el producto irritante.

15 Las causas más comunes de la dermatitis alérgica de contacto en adultos y niños incluye las siguientes: jabones, detergentes, perfumes, pañales, diferentes alimentos, lociones para bebés para piel áspera, plantas, así como los metales, cosméticos y medicamentos también pueden producir una reacción de dermatitis de contacto. La hiedra venenosa, que es parte de una familia de plantas que incluye el roble venenoso y plantas del género Rhus, es una de las causas más comunes de una reacción de dermatitis de contacto. Varios miles de agentes químicos son capaces de producir una dermatitis alérgica de contacto. El níquel, cromo y mercurio son los metales más comunes que producen dermatitis de contacto. El níquel se encuentra en la bisutería, hebillas de cinturón y relojes de pulsera, así como cremalleras, broches y corchetes en la ropa. Muchos tipos de cosméticos pueden producir dermatitis alérgica de contacto. Los tintes de pelo permanentes que contienen para-fenilendiamina o derivados de la misma, son las causas más frecuentes. Otros productos que pueden producir problemas incluyen los tintes de pelo semipermanentes o tintes usados para la ropa, perfumes, sombra de ojos, esmalte de uñas, barras de labios y algunos protectores solares. La neomicina que se encuentra en cremas con antibióticos, es la causa más común de dermatitis de contacto por medicamentos. La penicilina, sulfamidas y anestésicos locales, tales como novocaína o parabenos, son otras causas posibles.

20

25

30 Los síntomas más comunes de la dermatitis de contacto pueden incluir: enrojecimiento e hinchamiento leves de la piel, formación de ampollas en la piel, picor, descamación y engrosamiento temporal de la piel. La reacción más grave es en el sitio de contacto. Los síntomas de la dermatitis de contacto pueden parecerse a otras afecciones cutáneas. Sin embargo, cada individuo puede experimentar los síntomas de forma diferente.

35 La dermatitis herpetiforme es una enfermedad cutánea intensamente pruriginosa (que pica) caracterizada por erupciones de grupos de pequeñas ampollas o vesículas (pequeñas elevaciones de la piel que contienen líquido) y bultos pequeños o pápulas (pequeñas elevaciones sólidas en la piel). La dermatitis herpetiforme afecta principalmente a personas entre 15 y 60 años de edad. La dermatitis herpetiforme está relacionada con la presencia de depósitos de IgA bajo la piel. Estos depósitos se producen en respuesta al consumo de glútenes (proteínas) en la dieta, tales como los que se encuentran en los productos de trigo, cebada, centeno y avena. Sin embargo, una vez que se han producido los depósitos de IgA, el cuerpo los elimina lentamente aunque la persona no consuma gluten.

40

La enfermedad no es común entre afroamericanos o asiáticos. Las personas con dermatitis herpetiforme a menudo tienen una alta incidencia de trastornos autoinmunes y enfermedad de tiroides.

Los síntomas más comunes de la dermatitis herpetiforme pueden incluir: grupos de pequeñas ampollas que pican, con más frecuencia en codos, región lumbar, nalgas, rodillas y parte posterior de la cabeza, el picor y la quemazón a menudo son graves. La mayoría de las personas también tendrán algún daño en los intestinos.

45 Los síntomas de la dermatitis herpetiforme se pueden parecer a otras afecciones de la piel. Sin embargo, cada individuo puede experimentar los síntomas de forma diferente.

50 La dermatitis exfoliativa generalizada es una inflamación grave de toda la superficie de la piel, debida a una reacción a determinados fármacos, o como resultado de complicaciones de otra afección de la piel. En algunos casos, el cáncer de ganglios linfáticos (linfoma) puede producir la dermatitis exfoliativa generalizada. Sin embargo, con frecuencia no se puede encontrar una causa.

55 Los siguientes son los síntomas más comunes de dermatitis exfoliativa generalizada. Sin embargo, cada individuo puede experimentar los síntomas de forma diferente. Los síntomas pueden incluir: enrojecimiento extremo de la piel, descamación, engrosamiento de la piel, picor, ganglios linfáticos hinchados, fiebre, pérdida de líquidos y proteínas a través de la piel dañada. Los síntomas de la dermatitis exfoliativa generalizada se pueden parecer a otras afecciones de la piel.

Un quiste sebáceo o epidérmico, es un pequeño bulto que se mueve bajo la piel que aparece cuando las células cutáneas de la superficie se adentran más en la piel y se multiplican. Estas células forman la pared del quiste y segregan una sustancia blanda amarillenta, que llena el quiste. Si se rompe la pared, este material se descarga en la

piel de alrededor, lo cual produce irritación e inflamación. Los quistes sebáceos aparecen con frecuencia en el cuero cabelludo, cara, orejas, espalda o zona de la ingle. Un quiste sebáceo puede ser una glándula o conducto bloqueado.

5 La dermatitis seborreica es una inflamación de las capas superiores de la piel, caracterizada por piel roja que pica, que se descama. La dermatitis seborreica, una afección hereditaria, con frecuencia se agrava por condiciones climáticas frías. La dermatitis seborreica es común durante la infancia. En los bebés la afección se denomina también “costra láctea”, debido a su aspecto característico escamoso en el cuero cabelludo. Sin embargo, la costra láctea también se puede producir en la zona del pañal. La dermatitis seborreica en este grupo de edad normalmente desaparece por sí misma el primer año. Cuando la dermatitis seborreica se produce en la edad madura, la afección normalmente es más intermitente. Y cuando la dermatitis seborreica se produce en la vejez, normalmente la afección es más intermitente. Las personas con piel o pelo graso también tienen un riesgo mayor de desarrollar dermatitis seborreica.

15 Los síntomas asociados con la dermatitis seborreica pueden incluir: picor del cuero cabelludo, escamas secas o grasas en el cuero cabelludo, una erupción escamosa amarilla o roja en el nacimiento del pelo, detrás de las orejas, en el canal auditivo externo, en las cejas, alrededor de la nariz y/o en el pecho. Los síntomas de la dermatitis seborreica pueden parecerse a otras afecciones de la piel. Sin embargo, cada persona puede experimentar los síntomas de forma diferente.

20 El acné es una afección de la piel, que tiene poros tapados (espinillas negras y comedón cerrado), granos inflamados (pústulas), y bultos más profundos (nódulos). El acné se produce en la cara, así como en el cuello, pecho, espalda, hombros y parte superior del brazo. El acné puede desfigurar y ser molesto para el paciente. El acné sin tratar puede dejar cicatrices permanentes. Para evitar la formación de cicatrices por el acné, es importante tratar el acné.

25 Los queloides son eritematosos, tiernos, elevados, hiperpigmentados, de consistencia de firme a muy dura y con prurito variable debido a su contenido en mastocitos. Los queloides son crecimientos fibrosos benignos que se producen más habitualmente en razas de pigmentación más oscura. Un queloide cicatrizal debe haber permanecido más de 12 meses, y tener bordes que se extienden más allá de los límites de la herida original. Los queloides se producen a partir de lesiones en la piel tales como incisiones quirúrgicas, heridas traumáticas, sitios de vacunación, quemaduras, varicela, acné o incluso arañazos poco importantes. Se pueden irritar por el rozamiento con la ropa u otras formas de fricción.

30 Durante las fases tempranas de la curación de la herida, se deposita matriz extracelular mientras que los fibroblastos acumulan colágeno y proteoglicanos. En la piel normal o en una cicatriz madura, la velocidad a la que los fibroblastos acumulan colágeno y proteoglicanos disminuye con el tiempo. Sin embargo, en los queloides cicatrizales, el proceso de curación de herida continúa a una velocidad acelerada, con una proliferación con exceso de reactividad de los fibroblastos que continúa durante semanas o meses. La patogénesis de la formación de queloide todavía no se entiende del todo, pero se ha postulado que citoquinas como la interleuquina-1 y el factor de crecimiento transformante beta podrían ser responsables del cambio de metabolismo del colágeno, conduciendo por lo tanto a la formación de queloide, en concreto, que las células endoteliales neovasculares expresen el factor de crecimiento transformante beta, con la posterior producción de TGF beta por los fibroblastos adyacentes. La expresión de genes de colágeno de tipo I y VI también está potenciada en el tejido queloide.

40 El prurito es la palabra médica para la picazón. Se define como una sensación que provoca el deseo de rascarse. La picazón puede ser una fuente significativa de frustración e incomodidad para los pacientes. La causa exacta de una picazón es desconocida y es un proceso complejo. En último término implica nervios en la piel que responden a determinados compuestos químicos tales como la histamina, y que después procesan estas señales en el cerebro. El prurito puede ser un síntoma de determinadas enfermedades de la piel, y a veces una manifestación de un proceso interno. En otros pacientes en los que no hay pruebas de enfermedad interna o de la piel, el prurito puede deberse al procesamiento defectuoso de la sensación de picazón en el sistema nervioso.

50 Hay muchas afecciones, trastornos o enfermedades de la piel que pueden tener asociada la picazón con una erupción como síntoma predominante. Los ejemplos serían urticarias, sin limitar a varicela y eczema. Algunas afecciones de la piel solo tienen síntomas de prurito sin tener una erupción aparente. La piel seca, por ejemplo, es muy común en ancianos, y puede picar realmente (en especial en invierno), sin signos visibles de una erupción. El prurito normalmente es secundario a la piel seca delicada, pero puede ser una manifestación de una afección interna. Las picaduras de insectos y algunas infestaciones parasitarias de la piel, tales como sarna y piojos, que pueden picar mucho.

Heridas agudas y crónicas

55 Las heridas (es decir, laceraciones, grietas o úlceras) pueden ser agudas o crónicas. Las heridas agudas normalmente son lesiones penetrantes en la piel que implican poca pérdida de tejido. La mayoría de las heridas agudas se cierran y curan poniendo juntos los bordes de la herida. Las heridas crónicas son heridas que no consiguen curar completamente, o lo hacen lentamente. Los ejemplos de heridas crónicas incluyen úlceras por

presión (úlceras de decúbito), úlceras de piel diabética, úlceras por insuficiencia venosa, lesión por quemadura y defectos que se producen después de extirpación de tumor.

5 La morfología celular de una herida consiste en tres zonas distintas: un espacio central de la herida, una zona de gradiente de isquemia local y una zona de síntesis de colágeno activa. A pesar de la necesidad de la curación de heridas más rápida (es decir, quemaduras graves, incisiones quirúrgicas, laceraciones y otros traumatismos), hasta la fecha solo ha habido un éxito limitado en la aceleración de la curación de heridas sin agentes farmacológicos.

10 El objetivo principal en el tratamiento de las heridas es lograr el cierre de la herida. Las heridas cutáneas abiertas representan una categoría principal de heridas, que incluyen las heridas quirúrgicas agudas y traumáticas, p. ej., úlceras crónicas, heridas por quemaduras, así como heridas crónicas tales como úlceras neuropáticas, úlceras por presión, úlceras (estasis) arteriales y venosas o mixtas arteriovenosas, y úlceras diabéticas. Típicamente, estas heridas curan de acuerdo con el siguiente proceso: i) inflamación, ii) proliferación de fibroblastos, iii) proliferación de vasos sanguíneos, iv) síntesis de tejido conjuntivo, v) epitelización, y vi) contracción de la herida. La curación de la herida está deteriorada cuando estos componentes, sea de forma individual o en conjunto, no funcionan de forma adecuada. Los factores que pueden afectar a la curación de la herida incluyen la malnutrición, infección, agentes farmacológicos (p. ej., fármacos citotóxicos y corticoesteroides), diabetes y la edad avanzada (*Current Surgical*

15 *Diagnosis & Treatment*, Way; Appleton & Lange, 1988, 86-98).

20 Están disponibles muchos productos y protocolos diferentes para tratar las heridas crónicas (como se ilustra en *Brit. J. Plast. Surg.* 55: 2002, 185-193). Estos incluyen vendas simples (en concreto vendas compresivas), espumas y películas, geles y coloides, y productos farmacéuticos tales como factores de crecimiento. Típicamente se usa la curación de la herida con un vendaje oclusivo húmedo, en lugar de usar vendajes no oclusivos, secos (*Nature* 193: 1962, 293-294). Hoy en día se usan de forma rutinaria numerosos tipos de vendajes en la curación de heridas. Estos incluyen películas (p. ej., 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 (materiales compuestos no tejidos de fibras de alginato de calcio) y celofán (celulosa con un plastificante) (*Dermatol. Surg.* 21: 1995, 583- 590; *Burns* 10: 1983, 94). Algunos tipos de heridas (p. ej., úlceras diabéticas, úlceras por presión) y las heridas de determinados sujetos (p. ej., receptores de corticoesteroides exógenos) no curan a su debido tiempo (o en absoluto) usando estos vendajes de heridas.

25

30 La investigación ha mostrado que se puede inducir la curación de la mayoría de las úlceras mediante la aplicación de niveles adecuados de compresión graduada sostenida. Para pacientes con enfermedad venosa, la aplicación de compresión graduada externa, forzando que el fluido de los espacios intersticiales vuelva a los compartimentos vasculares y linfáticos, puede ayudar a minimizar o invertir los cambios vasculares y en la piel atribuidos al bloqueo o daño del sistema nervioso.

35 Además, también se han usado varias modalidades farmacéuticas (p. ej., la administración de sulfato de cinc, vitaminas A, C y D, calcio, magnesio, cobre y hierro) para intentar mejorar la curación de heridas. Sin embargo, excepto en circunstancias muy limitadas, la promoción de la curación de heridas con estos agentes ha tenido poco éxito.

Hay tres tipos de vendas que se usan habitualmente: (1) vendas de gasa extensibles ligeras, (2) vendas de apoyo ligeras, y (3) vendas de compresión que incluyen vendas de compresión ligera, moderada, alta y extra-alta.

40 En pacientes con quemaduras graves que no tienen o queda poca piel intacta, se usan construcciones de piel artificial o vendas celulares para cubrir y proteger la zona herida, pero que también promueven que vuelva a crecer una piel natural en lugar de tejido de cicatriz. Los ejemplos de dichas construcciones de piel artificial son Apligraf™, Trancyte™ o Ortec™.

Procedimientos cosméticos y dermatológicos

45 La exfoliación química (también llamada quimioexfoliación o dermoabrasión) consiste en la aplicación de una disolución química para eliminar la capa externa de la piel para tratar las líneas finas, arrugas, cicatrices leves, acné, decoloración de la piel, y crecimientos precancerosos. Las disoluciones exfoliantes pueden incluir uno o más compuestos químicos tales como alfa-hidroxiácidos, beta-hidroxiácidos, ácidos de frutas, ácido salicílico, disolución de Jessner, ácido tricloroacético, fenol o ácido carbólico. El efecto inmediatamente posterior a una exfoliación química es similar a la quemadura solar. Después de una exfoliación leve o superficial, el enrojecimiento y descamación de la piel dura de 3 a 5 días. La exfoliación de profundidad media o profunda puede producir enrojecimiento, hinchamiento, formación de ampollas y exfoliación durante 7 a 14 días. Se prescriben medicamentos para aliviar las molestias. Debe evitarse el exceso de exposición al sol durante un periodo de tiempo para prevenir el daño solar ya que la nueva piel es susceptible de dañarse.

50

55 La dermoabrasión consiste en un lijado o nivelación quirúrgicos (mediante el movimiento a una alta velocidad de cepillos de alambre rotatorio, fresas de diamante, ruedas dentadas, etc.) de la capa externa de la piel para mejorar el acné y otra cicatrices, eliminar tatuajes y minimizar las manchas de la edad, arrugas y determinados tipos de crecimientos de la piel. Es necesario el tratamiento posterior para el cuidado de la herida, en el que la reepitelización

normalmente se completa en aproximadamente 10 días. Los principales efectos posteriores son el enrojecimiento de la piel de forma similar a una quemadura solar grave, cicatriz hipertrófica o formación de queloide, hiper o hipopigmentación postinflamatoria. Los pacientes deben evitar la luz solar durante 3 a 6 meses después del tratamiento.

- 5 La microdermoabrasión es un tratamiento de rejuvenecimiento facial menos invasivo que usa micropartículas para desgastar y frotar la capa superior de la piel, aspirando las partículas de piel muerta. Se puede repetir a intervalos de tiempo. Los potenciales efectos posteriores son el enrojecimiento de la piel similar a una quemadura solar grave.

Los tratamientos con luz y/o láser comprenden muchas aplicaciones para renovación de la superficie de la piel y el rejuvenecimiento de la piel, eliminación de las manchas de edad, pelo, cicatrices, tatuajes y verrugas, así como para el tratamiento del acné, marcas de nacimiento, manchas de vino de Oporto, psoriasis, rosácea, estrías, venas, vitíligo y otras afecciones de la piel incluyendo queratosis actínica y cáncer de piel.

10 Pueden ser ablativos (daño y "ablación" superficial) o no ablativos (sin herida). Los tratamientos láser ablativos (CO₂, Er:YAG, Argón, etc.) requieren el cuidado de la herida después del tratamiento, y la reepitelización normalmente se completa en aproximadamente 10 días. El eritema típicamente dura hasta 3 a 4 meses y la piel puede quedar sensible durante meses. Existe el riesgo de cicatriz hipertrófica o formación de queloide, hiper o hipopigmentación postinflamatoria.

15 Los láseres no ablativos (láser con enfriamiento, láser de pulso largo, láser Fraxel, etc.) o tratamientos con luz (tratamientos con luz pulsada intensa (IPL), fotomodulación, luz infrarroja, etc.) son menos invasivos puesto que se dirigen a las capas inferiores de la piel (dermis) y dejan la epidermis principalmente sin daño. Los efectos secundarios son enrojecimiento y sensibilidad de la piel o hinchamiento mínimo durante algún tiempo.

20 Una alternativa a la renovación de la superficie de piel por láser es la renovación de la superficie electroquirúrgica, llamada también "crioablación". Esta técnica usa microradiofrecuencia eléctrica para suministrar un pulso de energía a la piel, eliminando o mejorando el daño de la piel de superficial a moderado. Este procedimiento tienen pocos efectos posteriores, y la recuperación del hinchamiento de leve a moderado normalmente se completa en un mes. La renovación de la superficie electroquirúrgica ofrece la ventaja de que se puede aplicar a la mayoría de los tipos y colores de piel, sin pérdida de la pigmentación de la piel.

25 La eliminación del vello superfluo puede contribuir a mejorar el aspecto general, con o sin rejuvenecimiento de la piel facial simultáneo. Los métodos tradicionales para tratar con el vello superfluo incluyen: (1) blanqueamiento con peróxido de hidrógeno para hacer el vello menos visible, (2) afeitado para eliminar temporalmente el vello, (3) arrancar el vello, (4) recubrir la piel con cera, y después quitar el vello con el recubrimiento de cera, (5) usar un agente de depilación químico para "disolver" el vello no deseado, y (6) electrolisis o electrotermolisis para destruir los folículos pilosos para la eliminación relativamente permanente del vello. La depilación química de la piel facial puede ser irritante. La eliminación del vello con láser en su uso más habitual se lleva a cabo por fototermolisis. Los efectos secundarios de la eliminación del pelo con láser incluyen el dolor posterior al tratamiento durante unas horas a unos días y enrojecimiento de la piel.

Otros procedimientos cosméticos y dermatológicos incluyen:

Flebotomía ambulatoria: eliminación de venas varicosas y de arañas no deseadas de las piernas por una serie de pequeñas incisiones a lo largo del camino de una vena agrandada.

Blefaroplastia: cirugía del párpado superior e inferior para eliminar piel floja y exceso de tejido graso.

40 Toxina botulínica: la terapia por inyección de toxina botulínica se usa para paralizar algunos músculos faciales que producen arrugas de fruncimiento, patas de gallo y otras arrugas. También se usa para mejorar las líneas del cuello y controlar el exceso de sudoración. Como alternativa a la toxina botulínica, se pueden usar sustancias de tipo toxina botulínica.

45 Cirugía cosmética: procedimientos estéticos para mejorar y rejuvenecer el aspecto de la piel, p. ej., renovación de la superficie de la piel por láser, relleno de arrugas, liposucción, exfoliación química, restablecimiento de pelo, etc.

Criocirugía o crioterapia: congelación del tejido de la piel con nitrógeno líquido para eliminar crecimientos de piel, manchas de la edad o verrugas.

Raspado y desecación: uso de un instrumento afilado para quitar por raspado tejido de la piel, seguido de la aplicación de una aguja eléctrica caliente para destruir los crecimientos de la piel.

50 Cirugía de colgajo: transferencia de tejido cutáneo adyacente, a menudo usado para mover piel que lleva pelo para cubrir zonas con calvicie del cuero cabelludo.

Inyección de materiales de relleno: los materiales de relleno son materiales (tales como colágeno, ácido hialurónico, hidroxiapatito de calcio, poli(ácido L-láctico), silicona, etc.) que se ponen o inyectan en líneas más profundas y arrugas. Los agentes de relleno típicamente se usan para aquellas arrugas que son demasiado profundas para

tratarlas con láser. Lo más habitualmente los agentes de relleno se usan para las arrugas de las líneas de sonreír, entre las cejas, para pómulos caídos o para mejorar el aspecto de los labios superiores e inferiores. También se puede mejorar el acné, la varicela y otras cicatrices hundidas.

5 Cirugía de restablecimiento de pelo: una variedad de técnicas, tales como el trasplante en sacabocados, mini y microinjertos, reducción del cuerpo cabelludo y colgajos de piel, para corregir la calvicie y restablecer el nacimiento del pelo de una persona.

10 Liposucción: la liposucción es la eliminación del exceso de grasa con un pequeño instrumento de tipo paja llamado cánula que se une a una máquina de succión. El uso de la liposucción tumescente permite que las cirugías dermatológicas eliminen de forma segura y eficaz las capas superficiales y profundas de la grasa no deseada, con anestesia local.

Microlipoinyección: una forma de aumento del tejido blando usando la propia grasa para rellenar y perfilar arrugas, pliegues y depresiones que se producen por envejecimiento, daño solar, lesión o cirugía.

Micropigmentación: un método permanente de implantar pigmento en la piel para añadir color para el tratamiento del vitíligo, injertos de piel o cicatrices de quemaduras y para propósitos cosméticos.

15 Cirugía micrográfica de Mohs: eliminación precisa del cáncer de piel capa a capa con ayuda de un microscopio.

Cirugía de la uña: eliminación o reparación de una anomalía de una uña con propósito de diagnóstico y/o tratamiento.

Escleroterapia: inyección de una disolución para eliminar las venas varicosas y arañas no deseadas de las piernas.

20 Materiales de relleno de tejido blando: las sustancias de relleno en general se usan para "mullir" y minimizar arrugas, surcos y agujeros en la cara, dando a la piel un aspecto más suave y más agradable. Se pueden inyectar bajo la piel. Los materiales de relleno tales como el colágeno bovino y materiales relacionados, la propia grasa y los implantes de polímeros son eficaces para perfilar sitios faciales específicos y corregir depresiones y cicatrices.

Xerosis o piel seca

25 La xerosis es el término médico para la sequedad de la piel. Este es un problema común en los climas más fríos. Cuando el aire frío y seco se calienta artificialmente se vuelve todavía más seco, actúa casi como una esponja, y "saca" agua de la piel por una intensa evaporación por la superficie. Puesto que el agua es el principal "suavizador" de la piel, la piel seca se puede volver áspera, escamosa y finalmente roja, inflamada y pica. En los casos graves estos cambios tendrán el aspecto de dermatitis. El tratamiento del "picor invernal" es para 1) aumentar la humedad relativa del aire; 2) reducir los factores que pueden exacerbar el problema, tales como el baño excesivo y el uso de jabones duros; y 3) humedecimiento de la piel con cremas, lociones o pomadas emolientes.

30 Preparación de proteínas de células cutáneas fetales

35 La lisis celular inducida (rotura celular inducida) de células cutáneas fetales, que se obtienen a una edad gestacional en la que la piel fetal cura sin formación o con poca formación de cicatriz después de una herida, proporciona proteínas de células cutáneas fetales para una orquestación (regulación) equilibrada de la inflamación de la piel, regeneración de la piel y reparación de la piel.

Dichas proteínas obtenidas después de lisis celular inducida comprenden una mezcla de una o más proteínas y pueden contener o no otros constituyentes de las células cutáneas tales como lípidos, polisacáridos y ácidos nucleicos y/u otras biomoléculas.

40 Dicha lisis celular inducida permite obtener dichas proteínas como una mezcla fisiológica, natural o normal (o naturalmente equilibrada) de proteínas presentes en la célula en el momento de la lisis celular inducida. A diferencia de obtener dichas proteínas por lisis celular inducida, la incorporación de células viables en una composición para el tratamiento de afecciones, trastornos o enfermedades de la piel no permite obtener dichas proteínas. Las proteínas obtenidas cuando las células viables se incorporan en una composición son de diferentes características y propiedades que las proteínas obtenidas por lisis celular inducida.

45 Dichas proteínas de células cutáneas fetales comprenden citoquinas, incluyendo factores de crecimiento, interleuquinas, linfoquinas, monoquinas, interferones, factores estimuladores de colonias y quimioquinas. Además, dichas proteínas de células cutáneas fetales comprenden también otras proteínas y péptidos tales como enzimas, proteínas estructurales de la matriz extracelular tales como colágeno, elastina, fibronectina, fibrilina y/o laminina. Dichas proteínas estructurales pueden estar presentes en forma de proteoglicanos, en los que la proteína está unida a cadenas de unidades de disacáridos que se repiten denominados glucosaminoglucanos (GAG).

50 Además, dichas proteínas de células cutáneas fetales también comprenden otras proteínas o péptidos incluyendo, pero sin limitar, neuropéptidos, antagonistas de neuropéptidos, proteasas y/o inhibidores de proteasas.

Las proteínas de células cutáneas fetales se pueden manipular, purificar, separar, concentrar, modificar, fraccionar, estabilizar y almacenar fácilmente. Además, las proteínas de células cutáneas fetales se pueden integrar en diferentes formas de suministro, vehículos y formulaciones con o sin las modificaciones previamente mencionadas.

5 Las células cutáneas fetales usadas para la preparación de proteínas de células cutáneas fetales se pueden obtener a partir de tejido cutáneo entero, fracciones de tejido cutáneo o biopsias cutáneas y/o células cutáneas obtenidas de un cultivo de células cutáneas fetales. Los cultivos de células cutáneas fetales o líneas celulares cutáneas fetales se obtienen de tejido cutáneo entero, fracciones de tejido cutáneo o biopsias cutáneas usando procedimientos y técnicas estándar de cultivo de células cutáneas. Las células cutáneas fetales o líneas celulares cutáneas fetales son células primarias (líneas celulares con una vida útil limitada).

10 Con el fin de obtener células cutáneas fetales o líneas celulares cutáneas fetales continuas o inmortalizadas, las células cutáneas fetales se pueden inmortalizar. Las células continuas o inmortalizadas son muy convenientes porque proporcionan un suministro estable y potencialmente infinito de células que tienen características definidas. En cambio, las células no inmortalizadas solo son capaces de crecer durante un número finito de divisiones celulares in vitro. Además, las células primarias tienen una mayor variabilidad que las células inmortalizadas haciendo que sea difícil obtener células y sustratos celulares con características reproducibles. El lado negativo de usar células inmortalizadas es que las líneas celulares inmortalizadas pueden ser de un fenotipo maligno. Sin embargo, los avances recientes en la capacidad para diseñar líneas celulares inmortalizadas usando técnicas de inmortalización bien definidas permiten producir líneas celulares continuas o inmortalizadas con poca probabilidad de ser de fenotipo maligno. Se han producido avances importantes en la tecnología de la inmortalización de células a lo largo de los últimos años. Las células somáticas o de mamífero normales tienen una vida útil finita en parte por su incapacidad para mantener la longitud de telómeros y la estabilidad cromosómica. La expresión de la telomerasa se ha usado, sea sola o junto con otros genes inmortalizados, para crear líneas celulares no oncogénicas, genéticamente estables, capaces aparentemente de proliferación indefinida.

25 La piel fetal (tejido cutáneo fetal) se obtiene de un feto humano o un feto animal. En general, el tejido cutáneo fetal humano se obtiene de cualquier edad gestacional. Sin embargo, es mejor obtener el tejido fetal durante el periodo de gestación de curación de heridas sin cicatriz antes de mitad de gestación hasta el inicio del tercer trimestre. Por ejemplo, el tejido cutáneo fetal humano preferiblemente se obtiene preferiblemente entre la semana 6 a 24 de gestación. Más preferiblemente, el tejido cutáneo fetal se obtiene entre las 8-18 semanas de edad gestacional. Lo más preferiblemente, el tejido cutáneo humano se obtiene de un feto humano entre las 12-16 semanas de gestación.

30 Las biopsias de piel fetal se pueden obtener después de interrupción del embarazo, después de cirugía en el útero o por endoscopia u otros medios en relación con el diagnóstico prenatal como describen Holbrook K.A. et al. (*Arch. Dermatol.* 1993, 129: 1437-1454) o Cadrin C. y Golbus M.S. (*West J. Med.* 1993, 159: 269-272).

35 En las mujeres que hacen una donación de tejido después de interrupción del embarazo, cirugía en el útero o diagnóstico prenatal, se hará una detección sistemática serológica de una variedad de enfermedades infecciosas, incluyendo pero sin limitar el virus de inmunodeficiencia humana, el virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, citomegalovirus y sífilis. La elegibilidad del donante y la serología del donante (madre) deben evaluarse de acuerdo con la normativa, directrices y recomendaciones actuales de la FDA (<http://www.fda.gov/cber/index.html>) y de la ICH (<http://www.ich.org>) en el momento de la recolección del tejido.

40 Cuando se obtiene tejido cutáneo fetal después de una interrupción del embarazo por razones médicas y/u otras razones, se puede obtener un trozo de tejido cutáneo fetal de un tamaño suficientemente grande para preparar un cultivo celular, por biopsia y/o extirpación quirúrgica de la piel fetal del feto abortado. La recolección del tejido se lleva a cabo de acuerdo con normas legales y éticas, cuando se lleva a cabo la interrupción del embarazo. El tejido cutáneo fetal obtenido después de interrupción del embarazo se usa para establecer un banco de células cutáneas fetales y/o línea celular cutánea fetal.

50 La intervención quirúrgica normalmente se lleva a cabo en fetos muy seleccionados con deformidades anatómicas que tienen una alta mortalidad o morbilidad grave en el tratamiento postnatal. En el futuro, será posible la intervención quirúrgica en el útero para una enfermedad no mortal cuando la cirugía fetal sea más segura para la madre y el feto. El tejido cutáneo fetal obtenido después de cirugía en el útero se puede usar para establecer un banco de células cutáneas fetales y/o línea celular cutánea fetal.

55 Con el fin de diagnosticar diferentes formas de genodermatosis (*J. Dermatol. Sci.* 1999, 19: 1-8) tales como enfermedades ampollasas (p. ej. epidermolisis ampollasa), enfermedades de queratinización (p. ej. ictiosis arlequín), trastornos celulares de pigmentación (p. ej. albinismo oculocutáneo), y trastornos de apéndices epidérmicos (p. ej. displasias ectodérmicas), así como para llevar a cabo la confirmación prenatal de la verdadera trisomía fetal 22 en mosaico del feto, se obtienen muestras de piel fetal por biopsia u otros medios.

En general, el diagnóstico prenatal se realiza entre las 16 y 22 semanas de gestación, dependiendo del diagnóstico. Se pueden usar muestras de piel no usadas para el diagnóstico, en el caso de que el feto no esté afectado por la enfermedad, para establecer un banco de células cutáneas fetales y/o línea celular cutánea fetal.

El tejido cutáneo fetal se fragmenta en trozos de tamaño pequeño a medio (p. ej., 0,5 mm³) mediante escalpelo, cuchillo y/o cualquier otro dispositivo de corte, y se ponen en placas de cultivo adecuadas (p. ej., placas de 10 cm de diámetro) con una densidad de siembra dada (p. ej., 10 trozos por placa de 10 cm).

5 Las células cutáneas fetales se obtienen por multiplicación a partir de fragmentos de tejido cutáneo fetal puesto en placas de cultivo en condiciones adecuadas de cultivo celular. Las condiciones adecuadas de cultivo celular incluyen, pero sin limitar, el uso de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero de ternero fetal al 10% (FCS) solo. La multiplicación celular se obtiene en condiciones convencionales de cultivo celular en un incubador de cultivo celular (p. ej., a 37°C en una atmósfera humidificada de >80% de humedad relativa del aire y 5 a 10% de CO₂).

10 Después de un tiempo de cultivo adecuado, en general entre 5 y 12 días dependiendo de las condiciones exactas de cultivo celular y el tejido cutáneo fetal seleccionado, las placas de cultivo que contienen el tejido cutáneo fetal restante y las células cutáneas fetales cultivadas se pueden separar con el fin de recoger células cutáneas fetales individuales procedentes del tejido cutáneo fetal. Para este propósito se usan preferiblemente enzimas tales como tripsina (p. ej., tripsina al 0,25% en ácido etilendiaminotetraacético al 0,1% (EDTA)) u otras enzimas proteolíticas (p. 15 ej., proteasas). En este punto, las células cutáneas fetales obtenidas a partir de tejido cutáneo fetal puestas en placas de cultivo, se pueden recoger, recolectar y opcionalmente almacenar antes de la posterior manipulación o uso. Las células se pueden recoger después de centrifugación (p. ej., 2000 g durante 15 min) u otros medios de recolección de células.

20 Opcionalmente, las células cutáneas fetales se pueden immortalizar. La producción de líneas celulares immortalizadas derivadas de tejidos celulares incluyendo queratinocitos cutáneos fetales se ha descrito previamente (Burnett TS et al., *J. Gen. Virol.* 64, 1983, 1509-1520; Brown KW et al., *Br. J. Cancer* 56, 1987, 545-554). En general dichos métodos comprenden la transfección o transformación de células.

25 La immortalización se refiere a la producción de células, que se pueden cultivar durante periodos de tiempo prolongados in vitro, idealmente de forma indefinida. Una célula inmortal es inmortal en condiciones de multiplicación definidas. Una célula se considera inmortal si se puede cultivar en condiciones de multiplicación definidas durante más de 20 pases, preferiblemente más de 30 pases, todavía más preferiblemente más de 40 pases, y todavía más preferiblemente durante más de 50 pases. Estas células se denominan también líneas celulares continuas. En cambio, las células no immortalizadas solo son capaces de multiplicarse durante un número finito de divisiones 30 celulares in vitro. Las células immortalizadas son muy deseables porque proporcionan un suministro estable y potencialmente infinito de células que tienen características definidas. En esta solicitud, las expresiones "condicionalmente inmortal" e "inmortal" se usan de forma intercambiable.

35 Las técnicas para producir líneas celulares fetales immortalizadas incluyen la irradiación, carcinógenos químicos, virus, virus recombinantes y ADN recombinante (Stacey G. and MacDonald C., *Cell Biol. Toxicol.* 17, 2001, 231-246). Para la immortalización de las células cutáneas fetales se usan preferiblemente técnicas para crear líneas celulares genéticamente estables y no oncogénicas. Por ejemplo, dicha técnica de immortalización consiste en la transfección de la subunidad catalítica del gen telomerasa (hTERT) en células primarias normales (Bodnar A.G. et al., *Science* 279, 1998, 349-352; Morales C.P. et al., *Nature Genetics* 21, 1999, 115-118). Este planteamiento se ha aplicado con éxito a fibroblastos cutáneos humanos (Vaziri H.F. and Bechimol S., *Oncogene* 18, 1999, 7676-7680) y otros tipos de células. Esta técnica de transfección permite obtener líneas celulares de vida útil prolongada, que a diferencia de las 40 producidas por transfección de oncogenes, son estables y retienen las características clave de las células primarias. Por otra parte, ahora se está aplicando el gen de immortalización, antígeno T de SV40, en nuevas combinaciones, en colaboración con la telomerasa, y en construcciones Cre-lox que permiten la immortalización reversible (Cascio S.M., *Artificial Organs* 25, 2001, 529-538).

45 Uno de los métodos más comunes para producir líneas celulares humanas immortalizadas implica el uso de secuencias de SV40 y más específicamente el ADN del antígeno T largo de SV40 como un agente de immortalización. Alternativamente, las células se pueden transfectar por electroporación u otras técnicas bien conocidas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 1988, incorporadas en la presente memoria por referencia.

50 Varias publicaciones científicas describen el uso de vectores de SV40 y vectores que contienen la secuencia del antígeno T largo de SV40 para producir líneas celulares immortalizadas. La introducción de dichas secuencias en general se realiza mediante infección usando el virus SV40 o con un virus híbrido de adenovirus-12-SV40, o por transfección de células con un plásmido recombinante que contiene la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous y la región temprana Ori-SV40, por coprecipitación con fosfato de estroncio.

55 Otro método conocido para producir líneas celulares immortalizadas, y en particular queratinocitos immortalizados, implica la transfección o infección de células con secuencias de ADN del virus del papiloma humano (HPV).

Otros métodos son el uso de al menos un gen o polipéptido seleccionado del grupo que consiste en productos 12S y 13S de genes E1A de adenovirus, hTERT, antígeno T pequeño de SV40, antígeno T largo de SV40, virus del papiloma E6 y E7, virus de Epstein-Barr (EBV), antígeno nuclear 2 del virus de Epstein-Barr (EBNA2), virus de

leucemia humano de linfocitos T tipo 1 (HTLV-1), HTLV-1 tax, Herpesvirus saimiri (HVS), mutante p53, myc, c-jun, c-ras, c-Ha-ras, h-ras, v-src, c-fgr, myb, c-myc, n-myc, y Mdm2.

5 Se ha descrito el uso de medio (o medios) exento de suero durante el aislamiento y la producción de células epiteliales inmortalizadas, y específicamente queratinocitos humanos. Por ejemplo, Barbosa et al. (*Oncogene*, 4, 1989, 1529-1532) describe inicialmente el cultivo de queratinocitos humanos transfectados por electroporación o lipofección en medio exento de suero con bajo contenido en calcio, hasta confluencia.

10 Las células fetales pueden secretar de forma natural una o más moléculas biológicamente activas. Alternativamente, las células se pueden modificar genéticamente para que secreten un nivel exógeno de una o más moléculas biológicamente activas. La secreción se puede controlar mediante cambio génico o puede ser constitutiva. Por ejemplo, las células se pueden modificar para que expresen o potenciar la expresión de una proteína u otro producto génico, o para eliminar una proteína o producto génico. Otras manipulaciones pueden incluir la introducción génica (inserción, sustitución) o inactivación génica (ablación) de un gen o mutación de un gen existente o producto génico.

15 Opcionalmente, las células se pueden someter a inactivación mitótica antes de usar. Por ejemplo esta inactivación mitótica se puede realizar por irradiación incluyendo la irradiación gamma o de rayos X, y/o luz UV. La inactivación también se puede realizar por la administración de inhibidores mitóticos basados en compuestos químicos y/o por incubación con mitomicina.

20 Una ventaja de la invención es la creación de un banco de células cutáneas fetales o sistema de banco de células cutáneas fetales, que permite el suministro sostenido e inmediato de proteínas celulares cutáneas fetales. Un sistema de banco celular es un sistema por el que se producen lotes sucesivos de un producto mediante cultivo celular, usando células obtenidas del mismo banco de células primario (MCB). Se usa una serie de recipientes del banco de células primario para preparar un banco de células de trabajo (WCB). En general el sistema del banco de células es validado para un nivel de pases o número de multiplicación de la población más allá del obtenido durante la producción rutinaria.

25 El banco de células primario es un cultivo de células distribuido en recipientes en una sola operación, procesados juntos, de modo que se asegure la uniformidad y almacenamiento de forma que se asegure la estabilidad. Un banco de células primario normalmente se almacena a -70°C o inferior. El banco de células primario en general está bien caracterizado. El banco de células de trabajo es un cultivo de células obtenido del banco de células primario y dirigido a usar en la preparación de cultivos celulares de producción. El banco de células de trabajo normalmente se almacena a -70°C o inferior.

30 Por ejemplo, un banco de células cutáneas fetales se obtiene o crea por recolección de tejido cutáneo fetal de una piel fetal de donante; cultivo del tejido cutáneo fetal y proliferación de las células cutáneas fetales en condiciones de cultivo celular adecuadas; separación por enzimas tales como tripsina, colagenasa y/u otras proteasas, del tejido y las células de los cultivos resultantes para permitir su suspensión; mezcla de las células cutáneas fetales suspendidas para hacer una suspensión de células generalmente uniforme a partir del cultivo; mezclar suavemente con un crioprotector (véase a continuación); sellar partes alícuotas de la suspensión de células cutáneas fetales en ampollas; y congelar las partes alícuotas (véase a continuación) preparando así un banco de células cutáneas fetales.

Preferiblemente, las células cutáneas fetales son fibroblastos dérmicos fetales y/o queratinocitos epidérmicos fetales, y/o melanocitos fetales o cualquier combinación o mezcla posible de los mismos.

40 Se pueden usar varios procedimientos para la crioconservación de células incluyendo tejidos así como proteínas. En las técnicas de congelación-descongelación, la disolución extracelular se congela, mientras que se toman medidas para minimizar la formación de hielo intracelular. En los procedimientos de vitrificación, se intenta prevenir la formación de hielo en toda la muestra. El procedimiento anterior es problemático en cuanto que si se forman cristales de hielo dentro de las células, son perjudiciales para la viabilidad celular tras la descongelación. Sin embargo, las células podrían sobrevivir al ciclo de congelación-descongelación si se enfriaran a velocidades controladas en presencia de niveles no tóxicos de crioprotectores. El último procedimiento de vitrificación busca evitar efectos potencialmente dañinos del hielo intra y extracelular, mediante disminución de la formación de hielo usando concentraciones muy altas de solutos y/o polímeros. Sin embargo, se puede producir daño celular por exposición prolongada a niveles tóxicos de estos aditivos necesarios para la vitrificación.

50 Se prefieren las disoluciones de crioprotectores que contienen glicerol, propilenglicol, etilenglicol y/o dimetilsulfóxido. En una realización preferida de esta invención, la disolución de crioprotector contiene glicerol de 1,5 M a 2,5 M, preferiblemente glicerol 2 M, en una base de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Estas disoluciones las puede modificar y optimizar un experto en la técnica, usando crioprotectores conocidos y procedimientos de congelación, almacenamiento, descongelación y lavado que son compatibles con mantener una viabilidad máxima, dependiendo de la aplicación particular.

La etapa de enfriamiento es una de las etapas más críticas en un protocolo de congelación-descongelación. Puesto que cada tipo de célula puede tener características drásticamente diferentes, las condiciones de crioconservación óptimas pueden variar en varios órdenes de magnitud para diferentes tipos de células. En una realización preferida

de esta invención, la congelación de las células en partes alícuotas adecuadas se logra disminuyendo la temperatura 1°C por min hasta que se alcanza una temperatura inferior a -70°C. Aproximadamente después de 24 horas, las células se transfieren a nitrógeno líquido y/o a la fase de vapor del nitrógeno líquido para su almacenamiento (durante 10 años o más) hasta su uso.

5 Las proteínas y otras biomoléculas o materiales relacionadas se obtienen por lisis celular inducida o rotura celular inducida (Becker et al.: *Biotech. Adv.* 1, 1983, 247-261; Schutte et al.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 12, 1990, 599-620). Aunque algunas proteínas biológicas son secretadas de la célula o liberadas durante la autólisis (lisis celular espontánea o natural), la preparación de muchas otras proteínas requiere la lisis celular inducida para obtener (liberar) proteínas dentro de la célula (proteínas intercelulares).

10 Existe una amplia variedad de técnicas o se están desarrollando, que intentan romper las células. Estas técnicas se pueden agrupar en dos categorías "mecánicas" y "no mecánicas". Se pueden usar solas o en combinación para romper las células. La rotura celular mecánica se logra usando homogeneizadores, molinos de bolas, de chorro, y sistemas de rotura de células constante. La rotura de células no mecánica se obtiene por medios físicos, químicos o enzimáticos. Los medios físicos son la descompresión, choque osmótico, termólisis o tratamiento con ultrasonidos. 15 El uso de antibióticos, agentes de quelación, detergentes, pH alto, agentes caotrópicos o disolventes, son medios químicos. El uso de enzimas líticas, lisis o autólisis son medios enzimáticos.

La molienda, homogeneización a alta presión (p. ej., prensa French, prensa X, etc.), tratamiento con ultrasonidos y congelación-descongelación, usan la cizalladura y presión para romper células. Por lo tanto, hay que tener cuidado para evitar o limitar la pérdida de actividad enzimática en las condiciones que se usan para lograr la rotura celular.

20 En una de las realizaciones preferidas, las células cutáneas fetales son lisadas (se rompen) por uno o múltiples ciclos de congelación-descongelación. Para este propósito, las células cutáneas fetales se suspenden en un sistema acuoso antes de la congelación-descongelación. Los sistemas acuosos incluyen, pero sin limitar, medios de cultivo (p. ej. DMEM, MEM, etc.), sistemas de tampones acuosos (p. ej. tampón a pH 7,4, etc.), tampones fisiológicos (p. ej. PBS, PBS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺, HEPEs, etc.), sistemas de tampones no fisiológicos, disolventes acuosos (p. ej. agua, etc.) y/o mezclas y combinaciones de los mismos. En una realización preferida de esta invención, las células se suspenden en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) con o sin Ca^(II) y Mg^(II) (llamada disolución salina tamponada con fosfato). 25

Las proteínas de células cutáneas fetales se obtienen después de congelación-descongelación de una suspensión (dispersión) de células cutáneas fetales obtenida por suspensión de células cutáneas fetales en el sistema acuoso con una concentración celular específica. La concentración celular de la suspensión de células cutáneas fetales puede variar entre unos miles a varios miles de millones de células por mililitro (ml) de sistema acuoso. En una de las realizaciones preferidas de la invención, la suspensión de células cutáneas fetales contiene entre 100 y 60.000.000 células cutáneas fetales por mililitro de sistema acuoso. En otra realización, la suspensión de células cutáneas fetales contiene entre 1.000.000 y 30.000.000 células cutáneas fetales por ml de sistema acuoso. En otra 30 realización, la suspensión de células cutáneas fetales contiene entre 5.000.000 y 25.000.000 células cutáneas fetales por ml de sistema acuoso. En una realización preferida, la suspensión de células cutáneas fetales contiene entre 10.000.000 y 20.000.000 células cutáneas fetales por ml de sistema acuoso. 35

Las proteínas de las células cutáneas fetales se preparan con células cutáneas fetales viables, con células cutáneas fetales no viables o con una mezcla de células cutáneas fetales viables y no viables. En una realización preferida de esta invención, las células cutáneas fetales con una viabilidad mayor de 80% se suspenden en el sistema acuoso y posteriormente se lisan mediante congelación-descongelación. 40

En otra realización, las células cutáneas fetales con una viabilidad igual o inferior a 80% se suspenden en el sistema acuoso y posteriormente se lisan por congelación-descongelación. En general, la lisis celular se lleva a cabo inmediatamente después de preparar la dispersión de células cutáneas fetales en el sistema acuoso. La viabilidad celular se puede medir usando ensayos de viabilidad celular clásicos. 45

Opcionalmente, el sistema acuoso usado para la congelación-descongelación se puede complementar antes de la lisis celular con crioprotectores, inhibidores de proteasa, inhibidores de glucosidasa, compuestos químicos estabilizantes de proteínas, compuestos químicos que previenen la desnaturalización de proteínas, antioxidantes, conservantes, antimicrobianos y/u otros compuestos químicos. La complementación puede ayudar a conservar y/o 50 estabilizar las proteínas de las células cutáneas fetales obtenidas después de lisis celular inducida de células cutáneas fetales. Por otra parte, la complementación puede ayudar a mantener o potenciar la potencia o la actividad de las proteínas de las células cutáneas fetales.

Las proteínas de las células cutáneas fetales se pueden purificar opcionalmente para obtener proteínas de células cutáneas fetales de una composición y/o pureza deseadas. Para este propósito, se pueden usar técnicas bien conocidas como las descritas en "Protein Analysis and Purification - Benchtop Techniques" (Rosenberg I.M., Birkhäuser, Boston), incorporadas en la presente memoria por referencia. 55

Opcionalmente, las proteínas de células cutáneas fetales se pueden separar en un sedimento (que contiene principalmente material no soluble) y un líquido sobrenadante (que contiene principalmente material soluble)

después de centrifugación. El líquido sobrenadante se puede integrar en un vehículo con o sin más manipulación y/o purificación. Contiene proteínas de células cutáneas fetales. Alternativamente, el sedimento celular se puede integrar en un vehículo con o sin más manipulación y/o purificación adicional.

- 5 Opcionalmente, las proteínas de las células cutáneas fetales o cualquier fracción de las mismas se puede modificar químicamente por acetilación, esterificación, pegilación, glicosilación y/o se pueden entrecruzar químicamente con un polímero con el fin de mejorar la estabilidad química/física y la actividad terapéutica de las proteínas de las células cutáneas fetales.

10 Una variedad de artículos conocidos para los expertos en la técnica, describen la estabilización de proteínas y se usa una amplia variedad de compuestos para la criopreservación (*Cryobiology* 25, 1988, 244-255; *Pharm. Res.* 8, 1991, 285-291; *Advanced Drug Delivery Reviews* 46, 2001, 307-326). Los crioprotectores más comunes incluyen, p. ej., azúcares, polioles, algunos aminoácidos y polímeros sintéticos. Otros crioprotectores incluyen, p. ej., sales inorgánicas, sales orgánicas o ingredientes variados. Los ejemplos no limitantes de azúcares adecuados incluyen, p. ej., sacarosa, lactosa, glucosa, trealosa y maltosa. Los ejemplos de polioles usados incluyen, p. ej., etilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol, inositol, xilitol, 2-metil-2,4-pentanodiol. Los ejemplos de aminoácidos usados incluyen, p. ej., glutamato de sodio, prolina, alanina, glicina, lisina e hidroxiprolina. Los ejemplos de polímeros usados incluyen, p. ej., polietilenglicol, dextrano y polivinilpirrolidona. Los ejemplos de sales inorgánicas usadas incluyen, p. ej., sulfato de sodio, sulfato de amonio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio y fluoruro de sodio. Los ejemplos de sales orgánicas incluyen, p. ej. acetato de sodio, polietileno de sodio, caprilato, propionato, lactato y succinato de sodio. Los ejemplos de crioprotectores variados incluyen, p. ej., dimetilsulfóxido, etanol, N-óxido de trimetilamina, sarcosina, bataína, ácido γ -aminobutírico, octopina, alanopina y estrombina.

25 Los inhibidores de proteasas se pueden usar además para prevenir la hidrólisis proteolítica de las proteínas de células cutáneas fetales. El inhibidor de proteasa incluye, pero sin limitar, inhibidores de serina proteasa (p. ej. leupeptina, antipaina, PMSF, AEBSF, etc.), inhibidores de cistina proteasa (p. ej. leupeptina, quimostatina, etc.), inhibidores de aspártico proteasa (p. ej. pepstatina A, etc.), inhibidores de metaloproteasas (p. ej. EDTA, 1,10-fenantrolina, bestatina, fosforamidon, TIMP 1, TIMP 2, etc.) y combinaciones de los mismos.

Los inhibidores de proteasas se añaden al sistema acuoso antes de llevar a cabo la lisis celular inducida y/o a las proteínas de las células cutáneas fetales después de llevar a cabo la lisis celular inducida. En una de las realizaciones preferidas, se añade EDTA al sistema acuoso usado para la congelación-descongelación.

Las proteínas se pueden conservar también por otros medios tales como congelación-secado o liofilización.

- 30 Por otro lado, se pueden añadir agentes para estabilizar las proteínas de células cutáneas fetales a la composición que comprende las proteínas de células cutáneas fetales.

35 El medio de cultivo celular suministra los componentes para la multiplicación celular en un entorno artificial, controlado, in vitro. Una vez que el medio de cultivo se incuba con las células, se conoce como medio "gastado" o "medio condicionado". El medio condicionado contiene muchos de los componentes originales del medio, así como una variedad de metabolitos celulares y proteínas secretadas, incluyendo, por ejemplo, factores de crecimiento biológicamente activos, mediadores inflamatorios y otras proteínas extracelulares. En una de las realizaciones de esta invención, el medio condicionado obtenido después de cultivar las células cutáneas fetales en un medio de cultivo celular, se puede usar e incorporar en un vehículo para la aplicación tópica.

Preparación de la composición

- 40 Las proteínas de células cutáneas fetales se pueden incorporar en un vehículo adecuado para la aplicación tópica, en mucosa, ocular, rectal y/o vaginal.

45 Los vehículos aceptables incluyen vehículos adecuados para la aplicación tópica, en mucosa, ocular, rectal y/o vaginal, y son aquellos en que se aplican de forma local; típicamente directamente en la piel y las membranas mucosas, así como a membranas mucosas y piel comprometida, no intacta o patológica y/o con herida. Esto está en contraste con las preparaciones sistémicas típicas, que se pueden tomar por vía oral o por inyección, y funcionan a través del sistema más que directamente en la superficie del cuerpo.

50 Preferiblemente, el vehículo es un vehículo aceptable por vía tópica. La expresión "vehículo aceptable por vía tópica" se refiere a cualquier vehículo, adyuvante, excipiente, diluyente, que se conoce en la técnica farmacéutica, alimentaria o cosmética para aplicar sobre la piel (o la capa epitelial del tejido mucoso) y está aprobado para la administración dérmica/mucosa. La elección del vehículo estará determinada por el agente activo particular, por ejemplo, su disolución en ese vehículo específico (hidrófilo/hidrófobo), así como por otros criterios tales como el tamaño y la naturaleza de la zona a la que se debe aplicar (por ejemplo, para el cuero cabelludo se pueden usar champús, mientras que para una zona pequeña es más aplicable un bálsamo, etc.).

55 Estos pueden incluir líquidos, cremas, aceites, lociones, pomadas, geles o sólidos aceptables por vía tópica, incluyendo, pero sin limitar, cremas cosméticas para la noche, cremas cosméticas para el día, cremas base, lociones bronceadoras, protectores solares, lociones para las manos, hidrogeles, maquillaje y bases de maquillaje, máscaras,

esponjas convencionales, y similares. Las composiciones pueden contener otros ingredientes opcionales adecuados tales como estrógeno, vitamina A, C y E, alfa-hidroxi o alfa-ceto-ácidos, tales como ácidos pirúvico, láctico o glicólico, lanolina, vaselina, aloe vera, metil- o propil-parebenos, pigmentos y similares. Los vehículos adecuados por vía tópica incluyen agua, vaselina, vaselina en bruto, aceite mineral, aceite vegetal, aceite animal, ceras orgánicas e inorgánicas, tales como cera microcristalina, parafínica y de ozocerita, polímeros naturales tales como xantanos, gelatina, celulosa, colágeno, almidón o goma arábiga, polímeros sintéticos, tales como los discutidos más adelante, alcoholes, polioles y similares. Los excipientes incluyen disolventes, tensioactivos, emolientes, conservantes, colorantes, fragancias y similares. Preferiblemente, el vehículo es una composición de vehículo miscible con el agua que es sustancialmente miscible en agua. Dicha composición de vehículo aceptable como cosmético tópico miscible con el agua puede incluir los hechos con uno o más ingredientes adecuados expuestos antes, pero también puede incluir un vehículo de liberación sostenida o retrasada, incluyendo composiciones que contienen agua, dispersables en agua o solubles en agua, tales como liposomas, microesponjas, microesferas o microcápsulas, pomadas de base acuosa, emulsiones de agua en aceite o de aceite en agua, geles o similares.

Las proteínas de las células cutáneas fetales se pueden incorporar en la composición entre 0,001% y 95% en volumen o peso. Las proteínas de células cutáneas fetales preferiblemente se incorporan entre 0,01 y 5% en volumen o peso.

En una de las realizaciones preferidas, las proteínas de células cutáneas fetales se preparan con una suspensión (dispersión) que contiene entre 10 millones y 20 millones de células por ml de tampón fisiológico (p. ej. PBS), y las proteínas de células cutáneas fetales así obtenidas se incorporan en un vehículo para aplicaciones tópica, en mucosa, ocular, rectal y/o vaginal, entre 0,05% y 0,25% en volumen o peso.

En diferentes realizaciones, el vehículo es una preparación o forma farmacéutica tópica. Las preparaciones tópicas son pomadas, cremas, geles y lociones. La definición de estas formas farmacéuticas tópicas se dan en Bhuse L. et al. (*Int. J. Pharm.* 295: 2005, 101-112).

En otra realización, el vehículo es un líquido, una espuma, una mousse, un pulverizador, un aerosol, una emulsión de aceite en agua, una emulsión de agua en aceite, una emulsión triple, una nanoemulsión, una microemulsión, un hidrogel, una disolución, una pasta, una gelatina y/o un dispersión o suspensión. El vehículo puede contener liposomas, liposomas, nanoesferas, microesferas, nanopartículas, micropartículas, gotitas de lípidos, partículas sólidas, pigmentos y/o gotitas de agua.

En una de las realizaciones preferidas, el vehículo es una crema. La crema pueden ser un vehículo basado en aceite en agua o un vehículo basado en agua en aceite. En otra realización preferida, el vehículo es un gel y/o un hidrogel.

Los expertos en la técnica reconocerán que cualquier referencia a una composición de la invención incluye cualquier composición que contiene una o más proteínas de células cutáneas fetales junto con un vehículo.

Las composiciones de la invención pueden contener opcionalmente proteínas estructurales de la matriz extracelular, colágeno, alginato, perlas de alginato, agarosa, chitosán, fibrina, adhesivo de fibrina, fibrinógeno, perlas de fibrina en plasma sanguíneo, ácido hialurónico, hialuronato de sodio, plasma completo o sus componentes, lamininas, fibronectinas, proteoglicanos, proteínas de choque térmico, chitosán, heparina, y/u otros polímeros sintéticos o polímeros estructurales y/o materiales sólidos de soporte.

Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden añadir agentes activos adicionales en los métodos y las composiciones de la invención. Estos agentes pueden incluir, p. ej., agentes antiinflamatorios, agentes antisépticos, antioxidantes, agentes antiacné, astringentes, agentes anorrectales, analgésicos, anestésicos, antipruriginosos, antiirritantes, agentes antimicrobianos, antibióticos, agentes antihistamínicos, agentes antipsoriasis, agentes antirrosácea, agentes anticicatriz, agentes anticaspa, agentes de crecimiento del cabello, agente contra la pérdida de cabello, agentes antifúngicos, antibióticos, vitaminas, agentes de curación de heridas, agentes queratolíticos, antioxidantes, hormonas, estimulantes, agentes de blanqueamiento de la piel, agentes protectores de la piel, agentes colorantes de la piel, agentes para quitar verrugas, protectores solares y cualquier combinación adecuada de los mismos. Se pueden añadir además ingredientes cosméticos.

Los analgésicos incluyen anestésicos locales amínicos y de tipo caína, anestésicos de tipo alcohol y cetonas, antihistaminas, hidrocortisonas y/o combinaciones adecuadas de los mismos.

Los anestésicos locales amínicos y de tipo caína, incluyen fármacos analgésicos externos sin receta incluyendo benzocaína, picrato de butambeno, dibucaína, dimetisoquina, diclonina, lidocaína, pramoxina, tetracaína, sus respectivas sales y combinaciones adecuadas de los mismos. En una realización preferida, se selecciona el hidrocloruro de pramoxina como analgésico. La realización preferida contiene de 0,5 a 1% de hidrocloruro de pramoxina.

Los anestésicos locales de tipo alcohol y cetonas incluyen fármacos analgésicos externos sin receta, incluyendo alcohol bencílico, alcanfor, mentol, fenol, resorcinol y combinaciones adecuadas de los mismos. En algunas realizaciones preferidas, se seleccionan como analgésicos alcanfor o mentol.

Los anestésicos locales de tipo antihistaminas incluyen fármacos analgésicos externos sin receta, incluyendo difenhidramina, tripelenamina, sus respectivas sales y combinaciones adecuadas de los mismos.

Los anestésicos locales de tipo hidrocortisona incluyen fármacos analgésicos externos sin receta, incluyendo hidrocortisona y acetato de hidrocortisona.

- 5 Los analgésicos sin receta antiirritantes incluyen isotiocianato de alilo, disolución diluida de amoniaco, salicilato de metilo, trementina vegetal, alcanfor, mentol, dihidrocloruro de histamina, nicotinato de metilo, capsaicina, capsicum, oleoresina de capsicum y combinaciones adecuadas de los mismos.

- 10 Los fármacos sin receta protectores de la piel incluyen alantoína, hidróxido de aluminio, calamina, manteca de cacao, aceite de hígado de bacalao, avena coloidal, dimeticona, glicerina, grasa dura, caolín, lanolina, aceite mineral, vaselina, almidón tópico, vaselina blanca, acetato de zinc, carbonato de zinc, óxido de zinc, acetato de aluminio, sulfato de aluminio y combinaciones adecuadas de los mismos.

- 15 Los fármacos sin receta antimicrobianos incluyen alcohol, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, metacresol alcanforado, fenol alcanforado, eucaliptol, hexilresorcinol, alcohol isopropílico, mentol, cloruro de metilbencetonio, salicilato de metilo, fenol, povidona yodada, timol, bacitracina, bacitracina de zinc, hidroccloruro de clortetraciclina, sulfato de neomicina, hidroccloruro de tetraciclina, clioquinol, haloprogina, nitrato de miconazol, tolnaftato, ácido undecilénico y sus sales de calcio, cobre y zinc, clotrimazol, resorcinol, monoacetato de resorcinol, ácido salicílico, azufre, peróxido de benzoilo y combinaciones adecuadas de los mismos.

Idealmente, los agentes, ingredientes y/o principios activos se elegirán de modo que no interfieran o interfieran mínimamente con la actividad de las proteínas de células cutáneas fetales.

- 20 La concentración o el intervalo de concentraciones de los fármacos sin receta anteriores son conocidos por los expertos en la técnica. Además, también son posibles diferentes combinaciones de estos fármacos sin receta.

- 25 La información relacionada con la preparación de las composiciones farmacéuticas se puede encontrar, p. ej., en Volume 3: Liquid Products, Volume 4: Semisolid Products y Volume 5: Over-the-Counter Products, del "Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations" (edited by S.K. Niazi, CRC Press, Boca Raton, 2004). Además, se puede encontrar información relacionada con la preparación de composiciones cosméticas y cosmeceúticas en el archivo de formulario de Happy Magazine (<http://www.happi.com/special/formulal.htm>). Además, también se puede obtener información de formulario para composiciones cosméticas y cosmeceúticas de los proveedores de diferentes ingredientes, tales como Croda, Ciba, BASF, Dow Chemicals, etc.

Usos de las composiciones

- 30 La invención proporciona una composición como en la reivindicación 1, para usar para tratar la vulvodinia que comprende la vestibulitis vulvar y el liquen escleroso vulvar.

El sujeto se puede seleccionar del grupo que consiste en seres humanos, primates no humanos, fauna silvestre, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas, conejos, ratas y ratones. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano o un animal, tal como un caballo, un perro o un gato.

- 35 La invención se define además por referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1. Toma de muestra de tejido cutáneo fetal

Se obtuvo una muestra de tejido cutáneo fetal (biopsia de piel) de piel fetal inmediatamente después de interrupción del embarazo, de acuerdo con las normas y procedimientos del Comité de Ética del University Hospital Lausanne, Suiza.

- 40 La elegibilidad del donante y serología del donante (madre) se evaluó de acuerdo con la normativa, directrices y recomendaciones actuales de la FDA (<http://www.fda.gov/cber/index.html>) y de la ICH (<http://www.ich.org>). La historia clínica y serología del donante eran compatibles con esas directrices y recomendaciones en el periodo de la donación del tejido.

- 45 La elegibilidad del donante incluía la evaluación de pruebas clínicas de VIH, hepatitis B, hepatitis C, EET humanas incluyendo la ECJ, treponema pallidum, y riesgos asociados con xenotransplante (no han recibido injertos de córnea y/o duramadre y no han recibido hormonas del crecimiento humanas obtenidas de cadáveres) mediante entrevista. El ensayo serológico incluía la evaluación de la presencia de VIH I, VIH II, citomegalovirus, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, rubéola, toxoplasmosis, treponema pallidum (sífilis), usando ensayos de anticuerpos validados. La historia clínica de la donante no puso de manifiesto ninguna prueba de la presencia de estos virus. Esto se confirmó por ensayo serológico en el momento de la biopsia y después de 3 meses.

- 50 En general, el tejido cutáneo fetal o biopsia de piel se obtuvieron antes de que se produjera la curación de la herida o reparación sin cicatriz; p. ej., antes de mitad de gestación hasta el inicio del tercer trimestre. En seres humanos, el

tejido de la donante humana o biopsia de piel era a las 12-16 semanas de gestación. Sin embargo, también se obtuvieron biopsias de donantes humanas a una edad gestacional anterior y posterior (incluyendo entre las semanas 6-11 y 17-24). En general, la biopsia era del grosor completo de la piel. Alternativamente, se llevó a cabo una biopsia de grosor parcial; contenía tejido cutáneo fetal dérmico y/o epidérmico. A una edad gestacional más temprana, la biopsia contenía predominantemente tejido cutáneo fetal dérmico. Con el fin de preparar un banco de células cutáneas fetales y/o línea celular cutánea fetal, se obtuvo un trozo (o muestra) de tejido cutáneo fetal de un tamaño suficientemente grande para preparar un cultivo celular por biopsia de piel fetal y/o escisión quirúrgica. En general, la muestra de tejido fetal era de 0,5 cm² a 8 cm².

También se obtuvo tejido cutáneo fetal (o biopsia de piel fetal) de un caballo. Se usaron métodos y procedimientos similares para obtener proteínas de células cutáneas fetales equinas, que los descritos en los siguientes ejemplos.

El experto en la técnica entenderá que hay otras posibilidades para obtener muestras de tejido cutáneo fetal para establecer un banco de células cutáneas fetales. El tejido cutáneo fetal se puede obtener después de cirugía en el útero y/o cuando se lleva a cabo un diagnóstico prenatal que requiere la toma de muestra de tejido cutáneo fetal.

Ejemplo 2: banco de células cutáneas fetales

Se da en el presente documento un procedimiento típico para establecer un banco de células cutáneas fetales que comprende un banco de células primario (MCB) y de trabajo (WCB), partiendo de tejido cutáneo fetal y/o una muestra de biopsia de piel fetal. En general, un banco de células se crea con piel fetal procedente de una donante. La muestra de piel fetal para crear el banco de células se obtuvo como se ha descrito en el ejemplo 1, después de interrupción del embarazo. La muestra de piel fetal (biopsia) se obtuvo a las 16 semanas de gestación y era de aproximadamente 4 cm².

A partir de la muestra de piel, se prepararon fragmentos de tejido de 0,5 mm³ y más pequeños mediante el uso de tijeras y/o escalpelos u otros dispositivos de corte. Después los fragmentos se sembraron en placas estériles (p. ej., 10 cm de diámetro) con aproximadamente 10 fragmentos por placa. Estos fragmentos se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (FCS, Hyclone) en un incubador a 37°C, 10% de CO₂ y 95% de humedad. El intercambio de medio se produjo cada segundo o tercer día. Cuando el crecimiento celular se aproximó a la confluencia después de aproximadamente 1-2 semanas, las placas de cultivo que contenían tejido y células cutáneas se tripsinizaron usando tripsina al 0,25% en ácido etilendiaminotetraacético al 0,1% (EDTA). Las células se transfirieron a un tubo de centrifugación y después se centrifugaron. Después, las células recogidas (que correspondían a las células en el pase 0) se volvieron a suspender en DMEM complementado con FCS al 10% y se sembraron en matraces T175 (Nalge Nunc) con 2000 células por cm². Después de alcanzar la confluencia, las células (pase 1) se recogieron como se ha descrito antes y después se sembraron en matraces T175 con 3000 células por cm² con el fin de obtener células en el pase 2. Después de recoger las células en el pase 2, se repartieron en partes alícuotas en crioviales adecuados (p. ej., 1,8 ml) y después se congelaron en nitrógeno líquido. Para este fin, las células se volvieron a suspender en una disolución de congelación de DMEM, FCS y dimetilsulfóxido (DMSO) en una relación de 5:4:1 (todos de Fluka) y se congelaron en partes alícuotas de 1 ml (que contenían de 4 a 8 millones de células) a -70°C o menos usando el recipiente de congelación Cryo 1°C (Nalge Nunc) para alcanzar una velocidad de enfriamiento de -1°C por minuto. Después de dejar las células durante 24 h en un recipiente de congelación, se transfirieron a nitrógeno líquido (o fase de vapor) para el almacenamiento. Se obtuvo un MCB de células cutáneas fetales que comprendía varios viales con células congeladas en el pase 2.

Se ensayaron en el MCB obtenido de las células cutáneas humanas los agentes endógenos y adventicios (esterilidad, micoplasma y virus) y la identidad con el fin de caracterizar el banco de células. Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo con los requisitos de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) (actuales) y con los principios (actuales) establecidos por la Agencia Europea del Medicamento (EMEA) y las directrices de la Administración Federal de Medicamentos (FDA) incluyendo las directrices de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) "Evaluación de la seguridad vírica de los productos biotecnológicos obtenidos de líneas celulares de origen humano o animal" (Q5A) y "Derivación y caracterización de sustratos celulares usados para la producción de productos biotecnológicos/biológicos" (Q5D).

El ensayo del MCB no detectó micoplasmas, bacterias u hongos. Se mostró por microscopía electrónica que el MCB no contenía partículas retrovíricas y no se detectó actividad de transcriptasa inversa retrovírica. Además, los ensayos basados en la PCR no detectaron ningún virus humano, incluyendo retrovirus humanos. Otros métodos de detección no detectaron otros agentes adventicios víricos en el MCB. Los resultados de los ensayos realizados en el MCB eran típicos de una línea celular humana. Se confirmó que la identidad era humana. En resumen, el ensayo indicaba que el MCB estaba exento de virus o agentes adventicios víricos, micoplasmas, bacterias y hongos.

El WCB se estableció usando un vial del MCB, sembrando las células en matraces de cultivo adecuados (p. ej., matraces T175 de Nalge Nunc), recogiendo aproximadamente en la confluencia, dividiendo en partes alícuotas y después congelando las células como se ha descrito para el MCB. El WCB se puede establecer en el pase 3. Por otro lado, el WCB se puede establecer en el pase 4 usando un vial del MCB después de realizar dos pases. Las

células del WCB se almacenaron en nitrógeno líquido (o fase de vapor) en crioviales con aproximadamente 2 a 6 millones de células por vial.

Se ensayaron en el WCB obtenido de las células cutáneas humanas los agentes adventicios (esterilidad y micoplasma) y la identidad con el fin de caracterizar el banco de células. Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo con los requisitos de las BPL (actuales) y con los principios (actuales) establecidos por la EMEA y las directrices de la FDA incluyendo las directrices de la ICH "*Derivación y caracterización de sustratos celulares usados para la producción de productos biotecnológicos/biológicos*" (Q5D).

El ensayo del WCB no detectó micoplasmas, bacterias u hongos. Los resultados de los ensayos realizados en el WCB eran típicos de una línea celular humana. Se confirmó que la identidad era humana. En resumen, el ensayo indicaba que el WCB estaba exento de micoplasmas, bacterias u hongos.

El experto en la técnica entenderá que aunque el banco de células se describe usando una muestra de piel fetal de 4 cm² de 16 semanas de gestación, obtenida después de interrupción del embarazo como se describe en este ejemplo, se pueden usar otras muestras de tejido cutáneo fetal obtenidas a otra edad gestacional y/u obtenidas después de cirugía en el útero y/u obtenidas después de diagnóstico prenatal (como se describe en el ejemplo 1), para establecer un banco de células con las modificaciones adecuadas de las condiciones descritas.

El experto en la técnica entenderá que muchos métodos de formación de bancos de células pueden conducir a la creación de un banco de células cutáneas fetales. Como alternativa sencilla al método descrito, se puede establecer un banco de células (MCB y/o WCB) en un incubador a 37°C, 5% de CO₂ y humedad >80%. Alternativamente, el banco de células se puede establecer usando diferentes recipientes de cultivo (p. ej., cualquiera de frascos de cultivo rotatorios, instalaciones celulares con múltiples bandejas, biorreactores celulares, etc.) y condiciones de cultivo (p. ej., exento de suero, etc.) con modificaciones adecuadas de las condiciones descritas.

Ejemplo 3: expansión de células cutáneas fetales

Con el fin de producir proteínas de células cutáneas fetales, se usan células cutáneas fetales del banco de células cutáneas fetales, se siembran en recipientes de cultivo adecuados, se cultivan (expanden, multiplican) en condiciones de cultivo adecuadas, se recogen después de un número de pases adecuado y posteriormente se lisan por medios mecánicos, físicos o químicos. En la presente memoria se da un procedimiento típico del proceso de expansión celular empezando con uno o más viales del WCB (obtenido como se ha descrito en el ejemplo 2). Se da un procedimiento típico de recolección de las células cutáneas fetales y la posterior lisis celular en el ejemplo 4.

El día de inicio, un vial de WCB (que contenía aproximadamente de 2 a 3 células Mio; las células estaban en el nivel de pase 3) se descongeló rápidamente en un baño de agua a 37 ± 2°C justo hasta que el hielo se fundía. El contenido del vial se añadió a aproximadamente 9 ml de DMEM, FCS al 10% previamente calentado y después se centrifugó a aproximadamente 200 g (aproximadamente 936 rpm) durante aproximadamente 10 min en un rotor oscilante Beckman GH3.8 (o equivalente). Después de centrifugación, el sedimento celular se volvió a suspender en aproximadamente 10 ml de DMEM, FCS al 10% de nueva aportación y se tomó una muestra para el recuento celular. Después la suspensión celular se sembró en cuatro matraces T225 (que presentan una superficie de cultivo celular de 225 cm², Nalge Nunc) en un volumen total de aproximadamente 40 ml de DMEM, FCS al 10% por matraz y se incubó en un incubador a 36,5 ± 1,5°C, 10 ± 1% de CO₂ y > 80% de humedad, durante 6 a 10 días hasta que los cultivos se acercaron a la confluencia. Se llevaron a cabo intercambios del medio cada segundo o tercer día. Después, el medio gastado (medio de cultivo condicionado) se retiró de forma aséptica de cada matraz y las láminas de células se lavaron con aproximadamente 10 ml de PBS previamente calentado (37 ± 2°C). Después de separar el PBS, se añadieron aproximadamente 3 ml de tripsina - EDTA (p. ej. Invitrogen, nº de ref. 25300-062) a cada matraz y se dejó que cubrieran las láminas de células en una posición horizontal durante aproximadamente 1 min. Después se descartó el lavado de tripsina para eliminarlo y se añadieron aproximadamente 3 ml adicionales de tripsina-EDTA a cada matraz. Los matraces se incubaron a 36,5 ± 1,5°C hasta que se observó visualmente o mediante microscopio que las células se desprendían. Después la tripsina-EDTA se neutralizó añadiendo aproximadamente 10 ml de DMEM, FCS al 10% a cada matraz. Después la suspensión celular se centrifugó a aproximadamente 200 g (936 rpm) durante aproximadamente 10 min en un rotor oscilante Beckman GH3.8 (o equivalente). El sedimento celular resultante se volvió a suspender en un volumen adecuado de DMEM, FCS al 10% de nueva aportación. Se tomó una pequeña muestra (p. ej., 0,5 ml) para el recuento celular.

A continuación, la suspensión celular así obtenida se expandió en 10 a 20 matraces T500 (que presentaban una superficie de cultivo celular de 500 cm², Nalge Nunc), con una densidad de siembra de 2000 a 3000 células por cm² en un volumen total de 150 ml de DMEM, FCS al 10% por matraz. Los cultivos celulares se incubaron en un incubador a 36,5 ± 1,5°C, 10 ± 1% de CO₂ y > 80% de humedad, durante 8 a 12 días hasta que los cultivos se acercaron a la confluencia. Se llevaron a cabo intercambios del medio cada segundo o tercer día. Después, el medio gastado (medio de cultivo condicionado) se retiró de forma aséptica y las láminas de células se lavaron con aproximadamente 30 ml de PBS previamente calentado (37 ± 2°C). Después de separar el PBS, se añadieron aproximadamente 30 ml de tripsina-EDTA (p. ej. Invitrogen, nº de ref. 25300-062) a cada matraz y se dejó que cubrieran las láminas de células en una posición horizontal durante aproximadamente 1 min. Después se descartó el lavado de tripsina y se añadieron aproximadamente 30 ml de tripsina-EDTA de nueva aportación a cada matraz. Los

matraces se incubaron a $36,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ hasta que se observó visualmente o mediante microscopio que las células se desprendían. Después la tripsina-EDTA se neutralizó añadiendo aproximadamente 30 ml de DMEM, FCS al 10% a cada matraz. La suspensión celular se centrifugó a aproximadamente 200 g (aproximadamente 936 rpm) durante aproximadamente 10 min en un rotor oscilante Beckman GH3.8 (o equivalente). El sedimento celular resultante se volvió a suspender en un volumen adecuado de DMEM, FCS al 10% de nueva aportación. Se tomó una muestra (p. ej., 0,5 ml) para el recuento celular.

Después la suspensión celular se expandió en 100 matraces T500 con una densidad de siembra de 2000 a 3000 células por cm^2 en un volumen total de aproximadamente 150 ml de DMEM, FCS al 10% por matraz. Los cultivos celulares se incubaron en un incubador a $36,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, $10 \pm 1\%$ de CO_2 y $> 80\%$ de humedad, durante 8 a 12 días hasta que los cultivos se acercaron a la confluencia. Se llevaron a cabo intercambios del medio cada segundo o tercer día. Este procedimiento permitió obtener células cutáneas fetales en el nivel de pase 6.

El experto en la técnica entenderá que este procedimiento de expansión celular se puede extender a pases adicionales de forma similar a la que se describe en este ejemplo, con las modificaciones adecuadas de las condiciones dadas. En general, el procedimiento de expansión celular se detiene entre los pases 6 a 10 y las células se recogen como se describe en el ejemplo 4.

El experto en la técnica entenderá que aunque la expansión celular se describe usando matraces de cultivo, se puede usar cualquiera de frascos de cultivo rotatorios, instalaciones celulares con múltiples bandejas, y/o biorreactores celulares, con modificaciones adecuadas de las condiciones descritas.

El experto en la materia también entenderá que se puede usar cualquier método de expansión celular. Como alternativa sencilla del método descrito, la expansión celular se puede establecer en un incubador a 37°C , 5% de CO_2 y $> 80\%$ de humedad. Alternativamente, la expansión celular se puede establecer en medios de cultivo exentos de suero, parcialmente exentos de suero y/o con suero reducido, usando tecnología y métodos de cultivo celular convencionales.

Ejemplo 4: recolección de células cutáneas fetales y preparación de proteínas de células cutáneas fetales

En este ejemplo se da un procedimiento típico de recolección de células cutáneas fetales y posterior lisis de las células cutáneas fetales con el fin de obtener proteínas de células cutáneas fetales. La recolección de las células cutáneas fetales obtenidas después de expansión (pases, multiplicación) en uno o más viales de WCB como se ha descrito en el ejemplo 3, se lleva a cabo como sigue:

1) Tomar el matraz (p. ej., matraz T500) que contiene el cultivo de células cutáneas fetales y separar de forma aséptica el medio de cultivo gastado (medio de cultivo condicionado).

2) Añadir el volumen adecuado de PBS previamente calentado (p. ej.: aproximadamente 30 ml para el matraz T500; a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) para lavar las láminas de células. Sacudir suavemente el matraz hacia atrás y hacia delante para lavar bien las células y después separar el PBS de forma aséptica.

3) Añadir tripsina-EDTA (p. ej., aproximadamente 50 ml para el matraz T500; p. ej., Invitrogen, nº de ref. 25300-062) al matraz para cubrir las láminas de células en una posición horizontal durante aproximadamente 1 min.

4) Descartar la tripsina-EDTA y después añadir tripsina-EDTA de nueva aportación (p. ej., aproximadamente 50 ml para el matraz T500).

5) Poner el matraz a $36,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, hasta que se observe visualmente o por microscopio que las células se desprenden.

6) Añadir un volumen adecuado de medio de cultivo DMEM, FCS al 10% (p. ej., aproximadamente 50 ml para el matraz T500) para neutralizar la tripsina-EDTA y reunir las suspensiones celulares en un tubo de centrifugación estéril.

7) Lavar el matraz con medio de cultivo (p. ej., aproximadamente 50 ml para el matraz T500) y transferirlo de forma aséptica al mismo tubo de centrifugación.

8) Centrifugar el tubo durante un tiempo y velocidad adecuadas a temperatura ambiente (p. ej., a aproximadamente 200 g (aproximadamente 936 rpm) durante aproximadamente 10 min en un rotor oscilante Beckman GH3.8 (o equivalente))

9) Retirar y descartar el líquido sobrenadante

10) Añadir un volumen adecuado de medio de cultivo DMEM, FCS al 10% al sedimento celular (p. ej., aproximadamente 50 ml para el sedimento obtenido de un matraz T500) y volver a suspender el sedimento celular.

11) Retirar una muestra para realizar el recuento celular.

12) Centrifugar el tubo como antes y descartar el medio de cultivo sobrenadante.

13) Añadir el volumen adecuado de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) al sedimento celular (p. ej., aproximadamente 50 ml para el sedimento obtenido de un matraz T500) y volver a suspender el sedimento celular para lavar las células.

5 14) Centrifugar el tubo como antes y descartar el medio de cultivo sobrenadante.

15) Repetir las etapas de lavado con PBS 13 y 14

16) Añadir al sedimento celular 1 ml de PBS por 16.000.000 células viables. Alternativamente, se puede añadir 1 ml de PBS a un número inferior o superior de células cutáneas fetales con el fin de obtener una suspensión celular menos o más concentrada, respectivamente. Las suspensiones de células cutáneas fetales preferidas se preparan añadiendo 1 ml de PBS a 10.000.000 a 20.000.000 células cutáneas fetales viables.

17) Mezclar con el fin de volver a suspender completamente las células cutáneas fetales en PBS.

18) Inmediatamente después de volver a suspender las células cutáneas fetales (etapa 17), llevar a cabo 3 ciclos de congelación-descongelación. Un ciclo consiste en poner el tubo (o criovial) que contiene la suspensión de células cutáneas fetales en nitrógeno líquido hasta que la suspensión celular se ha disuelto completamente y después poner el tubo que contiene la suspensión celular congelada en un baño de agua a aproximadamente 37°C hasta que el contenido se descongele completamente. En cuanto se disuelve el último hielo residual cuando se descongela, volver a congelar inmediatamente poniendo el tubo (o criovial) que contiene la suspensión celular descongelada en nitrógeno líquido hasta que esté completamente congelada. Alternativamente se puede usar una mezcla de hielo seco en metanol (u otros alcoholes tales como etanol, isopropanol, etc.) para congelar. La descongelación también se puede llevar a cabo a temperatura ambiente. Este procedimiento permite la lisis celular de las células cutáneas fetales obteniendo así proteínas de células cutáneas fetales.

19) Realizar un ensayo de viabilidad celular convencional (p. ej., ensayo de MTT, ensayo de ATP, ensayo basado en fluorescencia, etc.) con una pequeña muestra de las proteínas de células cutáneas fetales así obtenidas. La viabilidad celular medida de las proteínas de células cutáneas fetales debe ser inferior a 10%. Preferiblemente, las proteínas de células cutáneas fetales no deben contener ninguna célula cutánea fetal viable y/o deben tener una viabilidad celular de 0%. En el caso en el que se mida una viabilidad celular mayor de 10%, se llevan a cabo ciclos de congelación-descongelación adicionales (como se describe en la etapa 18) con la suspensión obtenida después de la etapa 18) hasta que se alcance una viabilidad inferior al 10%. Este procedimiento permite la lisis celular de células cutáneas fetales obteniendo de esta forma proteínas de células cutáneas fetales.

20) Opcionalmente, las proteínas de células cutáneas fetales obtenidas durante las etapas 1 a 9 se pueden tratar, separar en el líquido sobrenadante y el sedimento celular, y/o purificar con el fin de obtener proteínas de células cutáneas fetales de una composición, pureza, concentración y/o potencia adecuadas. Para este propósito, se siguen las técnicas descritas en "Protein Analysis and Purification - Benchtop Techniques" (Rosenberg I.M., Birkauser, Boston).

21) Finalmente, repartir en partes alícuotas las proteínas de células cutáneas fetales en crioviales adecuados (p. ej., criovial con rosca interna de 3,6 ml de Nunc).

22) Almacenar las proteínas de células cutáneas fetales a -70°C o inferior hasta su uso.

El experto en la técnica entenderá que aunque la recolección celular se describe usando matraces de cultivo, se puede usar cualquiera de frascos de cultivo rotatorios, instalaciones celulares con múltiples bandejas, y/o biorreactores celulares, con modificaciones adecuadas de las condiciones descritas.

El experto en la técnica también entenderá que, como alternativa al PBS, se puede usar cualquier otro tampón fisiológico (p. ej., PBS sin Ca⁺⁺ y/o sin Mg⁺⁺, HEPES, etc.) para lavar las células cutáneas fetales y preparar la suspensión de células cutáneas fetales para la lisis con las modificaciones adecuadas de las condiciones descritas. El experto en la técnica entenderá también que, como alternativa a un tampón fisiológico, se pueden usar otros sistemas acuosos (p. ej., medios de cultivo, tampones no fisiológicos, sistemas de tamponamiento de pH, agua, etc.) para preparar la suspensión de células cutáneas fetales para la lisis celular. El experto en la materia entenderá también que, el sistema acuoso usado para la congelación-descongelación se puede complementar con crioprotectores, inhibidores de proteasa, inhibidores de glucosidasa, compuestos químicos estabilizantes de proteínas, compuestos químicos que previenen la desnaturalización de proteínas, antioxidantes, conservantes, agentes antimicrobianos y/u otros compuestos químicos antes de la lisis celular.

Además, el experto en la técnica también entenderá que como alternativa a la congelación-descongelación, se puede usar una amplia variedad de técnicas de lisis celular para romper las células con el fin de obtener las proteínas de células cutáneas fetales con las modificaciones adecuadas de las condiciones descritas.

Las proteínas de células cutáneas fetales así obtenidas también se llaman "proteínas cutáneas procesadas", "proteínas de células cutáneas procesadas" o PSPTM.

Ejemplo 5: caracterización de las proteínas de células cutáneas fetales

Se analizó en las proteínas de células cutáneas fetales la presencia de citoquinas usando una matriz de citoquinas comercial (Cytokine Antibody Array C Series 1000.1, RayBiotech, Inc.). Esta matriz permitía detectar simultáneamente la expresión de múltiples citoquinas y está diseñada específicamente para los lisatos celulares. El análisis se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la matriz (RayBiotech, Inc) con el líquido sobrenadante de las proteínas de células cutáneas fetales obtenido después de centrifugación. No se llevó a cabo más manipulación del líquido sobrenadante así obtenido.

Las proteínas de células cutáneas fetales se obtuvieron como se ha descrito en los ejemplos 3 y 4 con células cutáneas fetales de un banco de células cutáneas fetales (establecido como se ha descrito en el ejemplo 2), que se inició con una muestra de piel de aproximadamente 16 semanas de gestación (obtenida como se ha descrito en el ejemplo 1). Excepto la centrifugación descrita antes de las proteínas de células cutáneas fetales, no se llevaron a cabo purificación, manipulación y/o complementación (como se describe en el ejemplo 4) de las proteínas de células cutáneas fetales.

El análisis puso de manifiesto la presencia de más de 100 citoquinas en las proteínas de células cutáneas fetales. Se detectaron proteínas de la mayoría de las familias de proteínas citoquinas incluyendo factores de crecimiento, interleuquinas, linfoquinas, monoquinas, interferones, factores estimuladores de colonias y quimioquinas.

Las citoquinas detectadas incluyen, pero sin limitar, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF-2), factor de crecimiento nervioso beta (b-NGF), factores de crecimiento de fibroblastos 4, 6 y 9 (FGF-4, FGF-6, FGF-9), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), interferón-gamma (IFN- γ), interleuquinas IL-1 alfa e IL-1 beta, interleuquinas IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13, antagonista del receptor de interleuquina-1 (IL-1ra), factor de crecimiento de queratinocitos 1 (KGF-1 o FGF-7), factor de crecimiento placentario (PGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta 1 y 3 (TGF- β 1, TGF- β 3), inhibidores tisulares de metaloproteasas 1 y 2 (TIMP-1, TIMP-2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Con esta matriz no se analizó la presencia de muchas otras citoquinas conocidas (p. ej.: TGF- β 2, FGF-10, etc.).

Se usaron además la electroforesis bidimensional en gel y la espectrometría de masas para analizar las proteínas de células cutáneas fetales. Los análisis se centraron en una región del gel que correspondía al punto isoeléctrico (pI) entre 4 y 8 y peso molecular de 8000 a 35.000. En este área se detectaron 373 ± 42 manchas ($n = 18$). Se analizaron algunas manchas y pusieron de manifiesto la presencia de varias enzimas antioxidantes incluyendo la superóxido dismutasa y tioredoxina peroxidasa.

El experto en la técnica entenderá que las proteínas de células cutáneas fetales (obtenidas como se ha descrito antes) contienen muchas más proteínas derivadas de la célula, proteínas de la matriz extracelular, glicoproteínas y/u otros constituyentes celulares o biomoléculas tales como lípidos, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, monosacáridos, polisacáridos, ADN y ARN, material inorgánico tal como minerales y sales, etc.

Además del análisis por matriz de citoquinas y electroforesis bidimensional en gel descritos en este ejemplo, se pueden usar otros métodos analíticos adecuados tales como ELISA, GC, HPLC, HPLC acoplado con espectroscopía de masas y/u otras plataformas analíticas y/o proteómicas, para caracterizar mejor las proteínas de células cutáneas fetales.

Ejemplo 6: actividad de las proteínas de células cutáneas fetales

Las proteínas de células cutáneas fetales caracterizadas en el ejemplo 5 se evaluaron respecto a la promoción de la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos o multiplicación celular. Las proteínas de células cutáneas fetales se obtuvieron como se ha descrito en los ejemplos 3 y 4 con células cutáneas fetales a partir de un banco de células cutáneas fetales (establecido como se ha descrito en el ejemplo 2), que se inició con una muestra de piel de aproximadamente 16 semanas de gestación (obtenida como se ha descrito en el ejemplo 1). No se llevaron a cabo purificación, manipulación y/o complementación (como se describe en el ejemplo 4) de las proteínas de células cutáneas fetales.

El ensayo de proliferación se llevó a cabo como sigue. Se sembraron fibroblastos dérmicos humanos normales en el pase 8 con DMEM (Invitrogen 21969035) y FCS al 10% en placas de 96 pocillos con 5000 células por pocillo. El medio de cultivo se cambió por DMEM nuevo con FCS al 2% durante 12 h. Se eliminó el medio de cultivo y se cambió por un medio nuevo de DMEM sin FCS que contenía (o no, control) los compuestos ensayados en diferentes concentraciones. Las células se incubaron durante 48 h a 37°C y 5% de CO₂. Se añadió el compuesto radiomarcado [³H]-timidina (Amersham TRK 686, 2,92 Tbq/mmol, 79 Ci/mmol) a cada medio de cultivo 24 h antes del final de la incubación. Todos los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado.

El análisis de la radiactividad incorporada en el ADN se llevó a cabo después de lisis celular y recolección del ADN por adición de 1 volumen de tampón caotrópico (Tris/HCl 50 mM, guanidina 4 M y EDTA 5 mM, pH 8,0), precipitación con ácido tricloroacético (TCA), recolección por filtración (colector y filtros Skatron), ciclos de lavado con TCA y etanol al 70% y posterior cuantificación por centelleo de líquidos de la radiactividad incorporada especialmente en el ADN (con respecto al nivel de proliferación).

Las proteínas de células cutáneas fetales se ensayaron entre 0,01% y 0,25% y dieron como resultado un aumento significativo de incorporación de timidina al 0,05% y 0,25%. El aumento era de 305% y 361% respecto al control, respectivamente. Al 0,01%, se observó una ligera estimulación (127% respecto al control).

- 5 En conclusión, este ensayo in vitro demostraba que las proteínas de células cutáneas fetales potenciaban la proliferación de fibroblastos dérmicos humanos aproximadamente 3 veces o más con una concentración de 0,05% a 0,25%.

Ejemplo 7: preparación de composiciones que comprenden proteínas de células cutáneas fetales

- 10 Este ejemplo ilustra la preparación de una serie de composiciones adecuadas para aplicaciones tópica, en mucosa, ocular, rectal y/o vaginal, que contienen proteínas de células cutáneas fetales. Las proteínas de células cutáneas fetales se obtuvieron como se ha descrito en los ejemplos 3 y 4 con células cutáneas fetales a partir de un banco de células cutáneas fetales (establecido como se ha descrito en el ejemplo 2), que se inició con una muestra de piel de aproximadamente 16 semanas de gestación (obtenida como se ha descrito en el ejemplo 1). No se llevaron a cabo purificación, manipulación y/o complementación (como se describe en el ejemplo 4) de las proteínas de células cutáneas fetales.

- 15 Las proteínas de células cutáneas fetales también se llaman "proteínas cutáneas procesadas", "proteínas de células cutáneas procesadas" o PSPTM.

Durante los experimentos in vitro (ilustrados en el ejemplo 6) se mostró que la concentración óptima de las proteínas de células cutáneas fetales en el vehículo, adecuada para las aplicaciones tópica, en mucosa, ocular, rectal y/o vaginal, estaba entre 0,05% y 0,25%.

- 20 Los siguientes ejemplos ilustran la preparación de composiciones que contienen 0,050% o 0,065% de proteínas de células cutáneas fetales.

- 25 Se preparó una crema basada en una emulsión de aceite en agua que contenía proteínas de células cutáneas fetales al 0,05% (obtenida como se describe en los ejemplos 3 y 4), usando técnicas de emulsión convencionales. La emulsión se obtuvo combinando una mezcla adecuada de tensioactivos iónico, de ion híbrido y/o no iónicos con agua (agua mineral o de manantial) y aceites adecuados. Se usaron aceites naturales, refinados y/o sintéticos adecuados. Los aceites naturales adecuados incluyen, pero no se limitan a: aceite de aguacate, aceite de albaricoque, aceite de borraja, aceite de semilla de borraja, aceite de camelia, aceite de canola, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de onagra, aceite de palma, aceite de almendra de palma, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de cártamo, aceite de almendras dulces, aceite de rosa mosqueta, aceite de caléndula, aceite de manzanilla, aceite de eucalipto, aceite de enebro, aceite de cártamo, aceite de sándalo, aceite de árbol de té, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de germen de trigo y/o mezclas de los mismos. En general, estos aceites se usan refinados y/o hidrogenados. También se pueden usar otros aceites adecuados tales como aceites animales, minerales (silicona) o sintéticos (p. ej., lanolina, vaselina, dimeticona, simeticona, triglicérido caprílico/cáprico, triglicéridos, ésteres de ácidos grasos, etc.). La formulación puede contener además emolientes y/o humectantes adecuados tales como glicerina, propilenglicol, butilenglicol, 1,3-butilenglicol, hexilenglicol, oleato de decilo, alcohol cetearílico, palmitato de cetilo, estearato de glicerilo y/o mezclas de los mismos. La emulsión también puede contener uno o una combinación de antioxidantes adecuados tales como tocoferol, acetato de tocoferilo, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, ascorbato magnésico, beta-caroteno, BHT, ácido ferúlico, ácido lipoico, coenzima Q10, flavonoides, extractos de té verde, extractos de té blanco, compuestos polifenólicos, ácido úrico, selenio y/o derivados de los mismos. Se pueden
- 30 añadir además sales seleccionadas tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio y sales de fosfato. Los azúcares tales como sacarosa, glucosa, maltosa, dextrosa y fructosa, alcoholes hidrónicos tales como sorbitol, manitol, xilitol y maltitol, y polímeros tales como carbómeros, polidextrosa, goma de xantano, goma de guar, alginato sódico, carragenano, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), metilcelulosa, polivinilpirrolidona (PVP), maltodextrina, carbómeros, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol (PEG), poli(óxido de etileno),
- 35 carboximetilcelulosa (CMC) e hidroxietilcelulosa (HEC), son ejemplos de modificadores de la reología adecuados para aumentar la viscosidad de la preparación.

- 40 Las proteínas de células cutáneas fetales se mezclaron en la fase acuosa exterior de una crema en emulsión de aceite en agua como una de las etapas finales durante la preparación de las composiciones basadas en emulsión de aceite en agua. La mezcla de las proteínas de células cutáneas fetales en la formulación se realizó a temperatura ambiente o a temperatura solo ligeramente elevada.

- 45 Las cremas 1, 2 y 3 (los ingredientes se dan a continuación) se obtuvieron después de preparar la base de la crema (formulación sin proteínas de células cutáneas fetales) usando técnicas de emulsión convencionales, y después, una vez que la base de la crema alcanzó la temperatura ambiente (entre 20°C y 30°C), mezclando las proteínas de células cutáneas fetales en la crema base usando métodos y equipamientos de mezclado convencionales, adecuados.

- 55 Los métodos y equipamientos de mezclado comprenden métodos de mezcla, combinación, emulsión, homogeneización y/o dispersión de la base de la crema con las proteínas de células cutáneas fetales, como se ha descrito antes.

Por lo tanto, las proteínas de células cutáneas fetales se diluyeron con un volumen adecuado de agua antes de mezclar la suspensión resultante (dispersión) en la base de la crema. En general, las proteínas de células cutáneas fetales se diluyeron con agua para dar del 2 al 5% en volumen (o peso) de la composición (formulación) final. En una realización preferida, las proteínas de células cutáneas fetales se añadieron a agua para dar el 3% en volumen de la formulación final, que después se añadió y mezcló con 97% de la base de la crema previamente preparada usando métodos y equipamientos de mezclamientos convencionales, adecuados.

Alternativamente, se pueden añadir conservantes (p. ej., parabenos, fenoxietanol, imidazolidinilurea, isotiazolinonas, glicoles, etc.), agentes estabilizantes de proteínas (p. ej., aminoácidos, polioles, azúcares, polímeros sintéticos, PEG, PEG-PPG-PEG, ácido hialurónico, hialuronato sódico, fibronectina, actina, colágeno, EDTA, etc.), inhibidores de proteasa y/o antioxidantes, en concentraciones adecuadas para la suspensión de proteínas de células cutáneas fetales así preparada, antes de la adición a la base de la crema.

El experto en la técnica entenderá que hay diferentes métodos para preparar cremas basadas en emulsión de aceite en agua. Alternativamente, las proteínas de células cutáneas fetales también se pueden mezclar en cremas basadas en emulsión de agua en aceite con las modificaciones adecuadas de las condiciones descritas.

15 Crema 1:

Se preparó una crema de aceite en agua que contenía proteínas de células cutáneas fetales (o PSP) al 0,05% como se ha descrito antes, y contenía los siguientes ingredientes adicionales en orden descendiente de predominio: agua, aceite de cacahuete hidrogenado, glicerina, hetilhexanoato de cetearilo, alcohol cetearílico, éster de alquilo C12-18 y PEG-8, PPG-25-éter de laurilo-25, éter de pentaeritritilo PEG-5, hidroxietilcelulosa, alcohol cetílico, palmitato de cetilo, estearato de glicerilo, cloruro sódico, palmitato de ascorbilo, glucosa, simeticona, acetato de tocoferilo, ácido cítrico, ricinoleth-40, cloruro de potasio y cloruro de magnesio. La crema contenía además una mezcla de metilparabeno, propilparabeno e imidazolidinilurea para la conservación antimicrobiana.

Crema 2:

Se preparó una crema de aceite en agua que contenía proteínas de células cutáneas fetales (o PSP) al 0,05% como se ha descrito antes, y contenía los siguientes ingredientes adicionales en orden descendiente de predominio: agua, octildodecanol, estearato de glicerilo, oleato de decilo, glicerina, propilenglicol, triticum vulgare (aceite de germen de trigo), ácido esteárico, alcohol cetílico, cetareth-20, miristato de mireth-3, cetareth-12, alcohol cetearílico, palmitato de cetilo, acetato de tocoferilo, dimeticona, borago officinalis (aceite de semilla de borraja), carbómero, trietanolamina, metilparabeno, propilparabeno, glicoesfingolípidos, EDTA de disodio y BHT. La crema contenía además una mezcla de fenoxietanol, etilparabeno, butilparabeno, metilisotiazolinona y metilcloroisotiazolinona para la conservación antimicrobiana.

Crema 3:

Se preparó una crema de aceite en agua que contenía proteínas de células cutáneas fetales (o PSP) al 0,065% como se ha descrito antes, y contenía los siguientes ingredientes adicionales en orden descendiente de predominio: agua, triglicérido caprílico/cáprico, éster de ácido C12-20 y PEG-8, butilenglicol, glicerina, isomerato de sacárido, PEG-8, alcohol cetílico, caprililglicol, fosfato de cetilo y potasio, carbómero, bisabolol, tetraisopalmitato de ascorbilo, cafeína, EDTA de disodio, fosfolípidos, ácido glicirretínico, hialuronato de sodio, poli(acrilato de sodio), ácido cítrico, propilparabeno, tocoferol, extracto de brotes de haya común (extracto de fagus sylvatica), aceite de palma (elaeis guineensis), tocotrienoles, palmitato de ascorbilo, escualeno, ácido ascórbico y fitosteroles. La crema contenía además una mezcla de fenoxietanol, metilparabeno, butilparabeno, etilparabeno e isobutilparabeno para la conservación antimicrobiana.

Crema 4:

Se preparó una crema de aceite en agua que contenía proteínas de células cutáneas fetales (o PSP) al 0,05% como se ha descrito antes, y contenía los siguientes ingredientes adicionales en orden descendiente de predominio: agua, triglicérido caprílico/cáprico, éster de ácido C12-20 y PEG-8, caprilato/caprato de coco, butilenglicol, dimeticona, fenil-trimeticona, goma de biosacárido 1, glicerina, alcohol cetílico, fenoxietanol, isomerato de sacárido, carbómero, fosfato de cetilo y potasio, borago officinalis (aceite de semilla de borraja), tetraisopalmitato de ascorbilo, caprililglicol, metilparabeno, EDTA de disodio, chondrus crispus (carragenano), hialuronato de sodio, aceite de elaeis guineensis (palma), tocotrienoles, fitosteroles, butilparabeno, etilparabeno, PEG-8, isobutilparabeno, propilparabeno, tocoferol, ácido cítrico, palmitato de ascorbilo, escualeno y ácido ascórbico.

Crema 5:

Se preparó una crema de aceite en agua que contenía proteínas de células cutáneas fetales (o PSP) al 0,065% como se ha descrito antes, y contenía los siguientes ingredientes adicionales en orden descendiente de predominio: agua, metoxicinamato de etilhexilo, éster de ácido C12-20 y PEG-8, triglicérido caprílico/cáprico, caprilato/caprato de coco, butilenglicol, butil-metoxidibenzoilmetano, alcohol cetílico, goma de biosacárido 1, glicerina, benzoato de alquilo C12-15, isomerato de sacárido, fenoxietanol, caprililglicol, dióxido de titanio, fosfato de cetilo y potasio,

carbómero, aceite de semilla de borago officinali, tetraisopalmitato de ascorbilo, metilparabeno, hidróxido de sodio, EDTA de disodio, chondrus crispus (carragenano), hialuronato de sodio, aceite de elaeis guineensis (palma), tocotrienoles, fitosteroles, butilparabeno, estearato de aluminio, poli(ácido hidroxiesteárico), etilparabeno, alúmina, PEG-8, isobutilparabeno, propilparabeno, tocoferol, ácido cítrico, BHT, palmitato de ascorbilo, escualeno y ácido ascórbico.

Las cremas 1 a 5 contienen antioxidantes seleccionados tales como ácido ascórbico, BHT, tocoferol y tocotrienoles así como algunos derivados de los mismos (palmitato de ascorbilo, tetraisopalmitato de ascorbilo, acetato de tocoferilo).

Las cremas 3 a 5 contienen agentes estabilizantes de proteínas tales como hialuronato de sodio, goma de biosacárido-1 y/o isomerato de sacárido.

Las cremas 2 a 3 contienen un inhibidor de proteasa: EDTA o EDTA de disodio.

La crema 5 contiene protectores solares (metoxicinamato de etilhexilo, dióxido de titanio).

Los hidrogeles son redes tridimensionales hidrófilas, que son capaces de embeber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos, y por lo tanto se parecen en gran medida a un tejido biológico (Peppas N.A. et al. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000, 50:27-46). Son insolubles debido a la presencia de reticulaciones químicas (puntos de unión, intersecciones) y/o físicas tales como enredos y cristalitas. Estos materiales se pueden sintetizar para responder a una serie de estímulos fisiológicos presentes en el cuerpo, tales como el pH, fuerza iónica y temperatura.

Los hidrogeles se basan en polímeros hidrófilos, que están reticulados para prevenir la disolución en agua. Debido a que los hidrogeles pueden contener grandes cantidades de agua, son dispositivos interesantes para el suministro de proteínas (*Int. J. Pharm.* 2004; 277: 99-104.).

Se pueden usar alginatos, colágenos, dextranos, gelatinas, almidón, dextrano-lactatos, ácido hialurónico, chitosán, poli(alcohol vinílico) (PVA), etileno-acetato de vinilo-poli-l-lactida, hidroxiapatito cerámico, N-vinilpirrolidona, polietilenglicol, copolímeros de polietileno-b-poli(óxido de propileno) (Pluronic®) y derivados de los mismos, para obtener hidrogeles cuando se mezclan con agua o una disolución acuosa.

Los hidrogeles se obtienen después de reticulación química o física. La reticulación se puede obtener por tratamiento con glutaraldehído, agregación durante el tratamiento de congelación-descongelación, y reticulación inducida por radiación (p. ej., luz UV) o escisión de cadena de proteínas cargadas. La formación de estereocomplejos entre cadenas de ácido láctico oligómeras enantioméricas después de mezclar disoluciones acuosas de dextrano(l)-lactato y dextrano(d)-lactato es un método de reticulación física (*Int. J. Pharm.* 2004; 277: 99-104.).

Gel 1:

Se preparó un gel que contenía proteínas de células cutáneas fetales (o PSP) al 0,05% usando Poloxámero 407 (Lutrol F127, BASF) entre 15 y 22%. También se añadieron conservantes.

Ejemplo 8: tratamiento de la vulvodinia y/o vestibulitis vulvar con la composición

Se evaluaron la crema 1 (preparada como se describe en el ejemplo 7) y la crema 2 (preparada como se describe en el ejemplo 7); dos formulaciones similares basadas en emulsión de aceite en agua y que contenían ambas proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, en las condiciones de uso para tratar el síndrome de vestibulitis vulvar.

Durante las primeras 6 a 8 semanas, las pacientes con vestibulitis vulvar se aplicaron la crema dos veces al día (por la mañana y por la noche) alrededor de la parte inferior del vestíbulo en una forma de U desde las 3 en punto a las 9 en punto, usando su dedo índice. Se aplicaron aproximadamente 0,2 ml por aplicación (correspondiente a aproximadamente el tamaño de un guisante). Después de 6 a 8 semanas, continuaron las aplicaciones una vez al día hasta que los síntomas se estabilizaron o desaparecieron. Una vez que los síntomas se estabilizaron o desaparecieron, continuaron con la aplicación de la crema una vez al día, o según conveniencia, con el fin de evitar la recurrencia de los síntomas.

La crema 1 se ensayó en un panel de 13 mujeres (entre 20 y 39 años de edad; 28 ± 5 años) con antecedentes clínicos de vestibulitis vulvar desde hacía tiempo (entre 2 y 10 años; 4 ± 3 años). La eficacia de la crema se evaluó de forma subjetiva durante una entrevista con la paciente preguntando sobre la calidad de su vida sexual como criterio de valoración. Todas las pacientes refirieron una mejor calidad de la vida sexual después de 3 a 8 semanas (5 ± 2 semanas) de uso de la crema dos veces al día (figura 1). El 62% de las pacientes refirió poder tener relaciones sexuales normales sin dolor después de este periodo. El 31% refirió una vida sexual mucho mejor y una paciente (8%) mejor. La crema era bien tolerada en todas las pacientes; no se refirieron ni observaron signos de irritación, alergia, taquifilaxia o cambio en la flora vaginal.

La crema 2 se ensayó en un panel de 10 mujeres (entre 17 y 30 años de edad; 23 ± 4 años) con antecedentes clínicos de vestibulitis vulvar desde hacía tiempo (entre 1 y 3 años; 2 ± 1 años). La eficacia de la crema se evaluó de

forma subjetiva durante una entrevista con la paciente preguntando sobre la calidad de su vida sexual como criterio de valoración.

5 Todas las pacientes refirieron una mejor calidad de la vida sexual después de 2 a 8 semanas (5 ± 2 semanas) de uso de la crema dos veces al día (figura 2). El 60% de las pacientes refirió poder tener relaciones sexuales normales sin dolor, y el 40% refirió una vida sexual mucho mejor después de este periodo. La crema era bien tolerada en todas las pacientes; no se refirieron ni observaron signos de irritación, alergia, taquifilaxia o cambio en la flora vaginal.

10 Además de la evaluación subjetiva del dolor vulvar mediante entrevista, los umbrales de dolor vulvar se determinaron cuantitativamente antes y después de tratamiento con el estesiómetro de Semmes Weinstein Von Frey (llamado también filamentos de Frey) en 6 de estas mujeres. Las mujeres tenían entre 17 y 30 años (24 ± 5 años) con antecedentes de vestibulitis vulvar durante 1 a 2 años (2 ± 0 años).

15 Se midió un aumento significativo de 30 veces en el umbral de dolor vulvar promedio de $3,7 \pm 3,2$ mN a $112,6 \pm 80,7$ mN después de 8 semanas de uso dos veces al día de la crema 2, lo que confirmaba los resultados obtenidos en la entrevista. Este último valor es cercano a 158 ± 33 mN descrito por Bohm-Starke et al. (*Pain* 2001, 94,177-183) para mujeres sanas.

20 Estos resultados combinados demuestran que la mejora de la vida sexual referida por las pacientes después y/o durante el tratamiento con la crema es el resultado de la capacidad de tener relaciones sexuales y/u otras actividades sexuales con poco o sin dolor. Además de un aumento del umbral de dolor por la presión inducida por la penetración vaginal o fricción y rozamiento de la vagina y la región vulvar, el uso repetido de la crema 1 y 2 como se ha descrito antes, también produjo la disminución del enrojecimiento o eritema vestibular (en el presente caso antes de uso de las cremas), prurito (picor) y sensaciones de quemazón.

En conclusión, la crema demostró ser beneficiosa para el tratamiento del síndrome de vestibulitis vulvar.

Ejemplo 9: tratamiento del liquen escleroso vulvar con la composición

25 Se ensayó la crema 2 (preparada como se describe en el ejemplo 7) en un panel de 9 mujeres (entre 17 y 30 años de edad; 23 ± 4 años) con liquen escleroso vulvar. La eficacia de la crema fue evaluada por un ginecólogo de forma visual. La aplicación de la crema 2 dos veces al día en la vulva produjo una mejora significativa de los síntomas del liquen escleroso vulvar. La crema era bien tolerada sin aparición de efectos adversos locales o sistémicos.

En conclusión, la crema demostró ser beneficiosa en el tratamiento del liquen escleroso vulvar.

Ejemplo 10: tratamiento de la dermatitis atópica o eczema con la composición

30 La crema 1 (preparada como se describe en el ejemplo 7), una formulación basada en emulsión de aceite en agua que contiene proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, se evaluó en las condiciones de uso para la dermatitis atópica o el eczema durante dos estudios.

35 En un estudio, la crema 1 se estudió en 5 pacientes con eczema en la mano atópico y/o irritativo. Los pacientes tenían entre 17 y 58 años (33 ± 16 años). Al principio del tratamiento, los pacientes se aplicaron la crema de dos a tres veces al día. Después, la frecuencia de las aplicaciones se redujo a de una a dos veces al día. Los pacientes se aplicaron la crema entre uno y varios meses. La evaluación global y los síntomas tales como el prurito, eritema, vesículas, edema, descamación, liquenificación y grietas o fisuras, se evaluaron usando una escala de 0 a 4 (0 = sin síntomas, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = grave, y 4 = muy grave) antes y después de tratamiento.

40 En todos los pacientes salvo uno, la gravedad global del eczema (evaluación global) disminuyó en al menos 1 punto después de 1 a 6 meses de uso de la crema (figura 4). Merece la pena mencionar en particular los síntomas de prurito (picor) significativamente reducidos y la presencia reducida en gran medida de escamas, grietas o fisuras después de usar la crema. El prurito se redujo completamente en todos salvo un paciente; las puntuaciones individuales de picor o prurito se redujeron 80% como media. Además, las puntuaciones individuales para el eritema se redujeron 58%, para las vesículas 50%, para el edema 67%, para las grietas 53%, para el liquen 28% y para las fisuras 53% de media para los 5 pacientes.

45 La crema era bien tolerada sin aparición de efectos adversos locales o sistémicos.

En otro estudio, la crema 1 se estudió en 23 pacientes con eczema, de los que 15 padecían manos gravemente agrietadas y secas; una forma de eczema de las manos. Los pacientes tenían entre 5 y 75 años. Los pacientes se aplicaron la crema hasta tres veces al día durante el periodo de evaluación.

50 El aspecto y los síntomas del eczema de las manos mejoraron significativamente en todos los pacientes salvo uno, después de algunas semanas a unos pocos meses de uso continuado. La crema era bien tolerada sin aparición de efectos adversos locales o sistémicos.

En conclusión, la crema 1 demostró ser beneficiosa en el tratamiento del eczema; en particular el eczema de las manos, y cura las manos agrietadas y secas.

Ejemplo 11: tratamiento de la psoriasis con la composición

5 La crema 1 (preparada como se describe en el ejemplo 7) se ensayó en un panel de 3 pacientes con psoriasis. Los pacientes se aplicaron la crema hasta tres veces al día durante el periodo de evaluación. El aspecto y los síntomas de la psoriasis mejoraron significativamente (figura 5) en todos los pacientes salvo uno. Este paciente no se aplicó la crema como se describe en el protocolo del estudio. El tratamiento era eficaz después de algunas semanas a unos pocos meses de aplicación diaria. La crema era bien tolerada sin aparición de efectos adversos locales o sistémicos.

En conclusión, la crema 1 demostró ser beneficiosa en el tratamiento de la psoriasis.

10 Ejemplo 12: tratamiento de la rosácea con la composición

La crema 2 (preparada como se describe en el ejemplo 7) se ensayó en varios pacientes con rosácea en combinación con regímenes de cuidado de la piel y/o medicación para la rosácea. Se describen a continuación dos casos de rosácea representativos; uno sin (caso 1) y otros con (caso 2) dermatitis seborreica concomitante.

15 En un estudio, antes de usar la crema 2 (preparada como se describe en el ejemplo 7) el paciente con rosácea (mujer caucásica, 58 años) usó el limpiador facial II MD Forte (contiene 15% de compuestos glicólicos), crema hidratantes rellena MD Forte y crema Physiogel® (Stiefel Laboratories) durante 6 semanas dos veces al día sin mejoras notables de la rosácea eritematotelangiectásica (figura 6, foto "Antes").

20 La administración de la crema Physiogel® se interrumpió y en su lugar la paciente usó la crema 2, junto con el mismo limpiador facial y crema hidratante usados durante las primeras 6 semanas. Se observó una disminución notable del eritema de la rosácea en toda la cara, frente, nariz, mejillas y barbilla después de dos semanas de dos aplicaciones diarias de la crema 2 (figura 6, foto "Después").

25 En otro estudio, antes de usar la crema 2, la paciente (mujer caucásica, 41 años) con antecedentes de 6 meses de erupción en la frente (no en el cuero cabelludo) se trató con Elocon® (pomada de furoato de mometasona al 0,1%; Schering Cop.) durante 2 semanas. El uso de Elocon® se interrumpió y después de una semana apareció la erupción en la frente de nuevo.

La paciente se aplicó entonces gel Finacea® (distribuido por Berlex Laboratories) dos veces al día durante 4 semanas en combinación con un limpiador RH y crema RH. La dermatitis seborreica y la rosácea mejoraron al menos 75% durante este periodo con una disminución en todas las lesiones inflamatorias y eritema de la frente (figura 7, foto "Antes").

30 Después de este periodo, la paciente empezó a usar la crema 2 en combinación con el gel Finacea® (el gel se aplicaba primero) junto con el limpiador RH y la crema RH. La adición de la crema 2 al régimen de tratamiento ayudó a la paciente a casi recuperarse de los síntomas. Después de 7 semanas de dos aplicaciones diarias, se observó una mejora notable adicional de la dermatitis seborreica y rosácea (figura 7, foto "Después").

Los pacientes con rosácea toleraban bien la crema sin aparición de efectos adversos locales o sistémicos.

35 En conclusión, la crema 2 demostró ser beneficiosa en el tratamiento de la psoriasis.

Ejemplo 13: tratamiento de heridas y/o quemaduras menores con la composición

La crema 1 (preparada como se describe en el ejemplo 7) y la crema 2 (preparada como se describe en el ejemplo 7), dos formulaciones similares basadas en emulsión de aceite en agua y que contienen ambas proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, se evaluaron en condiciones de uso para tratar heridas y/o quemaduras menores.

40 La crema 1 se ensayó en un panel de 8 pacientes con quemaduras de 1^{er} grado. Los pacientes tenían entre 5 y 68 años de edad. Los pacientes se aplicaron la crema hasta 3 veces al día durante el periodo de evaluación. El aspecto y los síntomas de las quemaduras mejoraron significativamente en todos los pacientes. El tratamiento fue eficaz después de algunas semanas de aplicación diaria. La crema era bien tolerada sin aparición de efectos adversos locales o sistémicos.

45 La crema 2 se ensayó para el tratamiento de lesiones cutáneas producidas después de criocirugía para eliminar manchas de edad en las manos. La aplicación de la crema dos veces al día durante 6 semanas condujo a una rápida curación de las lesiones cutáneas y dio como resultado una mejora significativa del aspecto, tono y textura de la piel (figura 8).

50 En conclusión, la crema 1 y la crema 2 demostraron ser beneficiosas en el tratamiento de heridas menores tales como quemaduras de 1^{er} grado y lesiones de la piel después de criocirugía.

Ejemplo 14: tratamiento de cicatrices y queloides

La crema 1 (preparada como se describe en el ejemplo 7) se ensayó en un panel de 11 pacientes con cicatrices y formación de queloides reciente. Los pacientes tenían entre 53 y 68 años. Los pacientes se aplicaron la crema hasta 3 veces al día durante el periodo de evaluación. El aspecto de las cicatrices y queloides mejoró significativamente en todos los pacientes en los que la cicatriz estaba presente desde hacía no más de un año. El tratamiento era eficaz después de algunas semanas a unos pocos meses de aplicación diaria. La crema era bien tolerada sin aparición de efectos adversos locales o sistémicos.

En conclusión, la crema 1 demostró ser beneficiosa en las cicatrices y queloides recién formados (menos de un año).

Ejemplo 15: uso de la composición como tratamiento después de autoinjerto o aloinjerto de piel

La crema 1 (preparada como se describe en el ejemplo 7), una formulación basada en emulsión de aceite en agua que contiene proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%, se evaluó en las condiciones de uso para el cuidado de la herida después de injerto de piel en quemaduras y úlceras.

La crema 1 se ensayó en un panel de 8 niños que padecía quemaduras de 2º y 3º grado. Como procedimiento estándar, la crema se aplicó después de cierre completo o parcial de la herida por la aplicación de una o más construcciones de células cutáneas. Además, la crema también se aplicó en sitios de la piel adyacentes al injerto, donde la piel estaba quemada en un grado menor. Los pacientes tenían entre 14 meses y 9 años. Los sitios del cuerpo incluían mano, brazo, pie, pierna y nalgas. La crema se aplicó hasta 3 veces al día durante el periodo de evaluación. El aspecto, la textura y el tono de la piel en el sitio de la herida y la formación de cicatriz mejoraron significativamente en todos los pacientes. El tratamiento con la crema era eficaz después de algunas semanas a unos pocos meses de aplicación diaria. La crema era bien tolerada sin aparición de efectos adversos locales o sistémicos.

En conclusión, la crema 1 demostró ser beneficiosa en el postratamiento de quemaduras después de autoinjerto o aloinjerto de piel. Además, la crema se puede usar con éxito en combinación con los injertos de piel con el fin de completar la curación de heridas. La crema era segura cuando se aplicaba en niños. Además, la crema era bien tolerada cuando se aplicaba sobre piel con las propiedades de barrera de la piel comprometidas.

La crema 1 se ensayó en un panel de 13 pacientes que padecían una úlcera por presión o diabética. Como procedimiento estándar, la crema se aplicó después de cierre completo o parcial de la herida por la aplicación de una o más construcciones de células cutáneas. Además, la crema también se aplicó en los sitios de la piel adyacentes al injerto y la piel periulcerosa. Y una vez que la herida se había cerrado o era demasiado pequeña para una posterior aplicación de construcción, se aplicó la crema dos veces al día como tratamiento de seguimiento. Los pacientes tenían entre 10 días y 85 años. Los sitios del cuerpo incluían la pantorrilla, tobillo, pie y brazo. La crema se aplicó hasta 3 veces al día durante el periodo de evaluación.

El aspecto, textura y tono de la piel en el sitio ulcerado y la formación de cicatriz mejoraron significativamente en todos los pacientes salvo uno. El tratamiento en este paciente se interrumpió debido al diagnóstico de diabetes. En un paciente varón (85 años de edad), la enfermedad recurrió después del tratamiento inicial satisfactorio. Como ejemplo, un niño nacido con una úlcera por presión en la capa muscular del brazo se trató satisfactoriamente a los 10 días de edad. El bebé recibió 3 injertos de piel y se trató en paralelo con la crema. Después del cierre de la herida el día 15 de tratamiento, la crema se aplicó sobre toda la zona de la piel durante varias semanas dando como resultado una curación de la herida perfecta y sin cicatriz. En la mayoría de los casos, el tratamiento con la crema era eficaz después de algunas semanas a unos pocos meses de aplicación diaria. La crema era bien tolerada sin aparición de efectos adversos locales o sistémicos.

En conclusión, la crema 1 demostró ser beneficiosa en el postratamiento de úlceras después de autoinjerto o aloinjerto de piel. Además, la crema se puede usar satisfactoriamente en combinación con los injertos de piel con el fin de completar la curación de la herida. La crema era segura cuando se aplicaba a bebés recién nacidos. Además, la crema era bien tolerada cuando se aplicaba sobre piel con las propiedades de barrera de la piel comprometidas.

Ejemplo 16: uso de la composición como tratamiento de la atrofia blanca

La atrofia blanca es un tipo particular de cicatriz que se produce en la parte baja de las piernas. Se produce después de una lesión de la piel cuando el suministro de sangre es pobre. Es la lesión característica de la vasculitis livedoide. La vasculitis livedoide es un trastorno vascular crónico raro, caracterizado por la ulceración dolorosa persistente de las extremidades inferiores. Las características de la vasculitis livedoide incluyen (1) marcas rojas o púrpura dolorosas y manchas que evolucionan a úlceras pequeñas, tiernas, irregulares (30% de los casos), y (2) cicatrices de atrofia blanca no dolorosas.

La crema 1 (preparada como se describe en el ejemplo 7) se ensayó en un panel de 3 pacientes con atrofia blanca. Los pacientes tenían entre 37 y 76 años. Los pacientes se aplicaron la crema hasta 3 veces al día durante el periodo de evaluación. El aspecto y síntomas de la atrofia blanca disminuyeron significativamente en todos los pacientes con estabilización significativa de la piel atrofica y zona de alrededor. El tratamiento era eficaz después de algunas semanas a algunos meses de aplicación diaria. La crema era bien tolerada sin aparición de efectos adversos locales o sistémicos.

En conclusión, la crema 1 demostró ser beneficiosa en el tratamiento de la atrofia blanca.

Ejemplo 17: uso de la composición como tratamiento para otras afecciones, trastornos y enfermedades de la piel

5 Diferentes estudios del uso demostraron una eficacia significativa de la crema 1 y/o crema 2 (preparadas como se describe en el ejemplo 7; ambas formulaciones basadas en emulsión de aceite en agua que contienen proteínas de células cutáneas fetales al 0,05%) en el tratamiento, alivio o mejora del aspecto de la radiodermatitis, urticaria de contacto, dermatitis de contacto o dermatitis de contacto irritante, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis por quemadura solar y/o fotodermatitis, picor o prurito generalizado, picor o prurito rectal externo, picor o prurito localizado en el pene o escroto, picor o prurito localizado debido a la exposición al roble venenoso y la hiedra venenosa así como a picaduras de insectos y/o picor o prurito en sitios de la piel con cicatriz o queloide.

10 Ejemplo 18: uso de la composición como tratamiento después de procedimientos cosméticos/dermatológicos.

15 Diferentes estudios del uso demostraron una eficacia significativa de la crema 2 (preparada como se describe en el ejemplo 7) para mejorar la recuperación, regeneración de la piel y/o curación después de exfoliación química, dermoabrasiones y microdermoabrasiones, tratamientos con luz y láser, tratamientos con radiofrecuencia, tratamientos térmicos, renovación de la superficie de la piel o coablación electroquirúrgica (CO₂-láser y radiofrecuencia), eliminación del vello superfluo, diferentes procedimientos quirúrgicos cosméticos, criocirugía y/o otros procedimientos cosméticos y dermatológicos diferentes.

El tratamiento con la crema ayuda a mejorar la curación de la piel y a la recuperación después de esos tratamientos dando como resultado un aspecto, tono y textura de la piel mejorados.

Ejemplo 19: uso de la composición para reducir los signos de envejecimiento de la piel

20 Un estudio del uso demostró la eficacia significativa de la crema 2 (preparada como se describe en el ejemplo 7) en la mejora del aspecto, tono y textura de las líneas finas y arrugas faciales, incluyendo el pliegue nasolabial (figura 9).

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una composición para usar en el tratamiento de la vulvodinia que comprende una o más proteínas de células cutáneas fetales y un vehículo aceptable, en la que dichas células cutáneas fetales se obtienen de una o más células fibroblastos fetales humanas después de lisis, en la que la una o más células fibroblastos fetales humanas se han obtenido a las 12-16 semanas de gestación.
- 2.- Uso de una composición de la reivindicación 1, en la fabricación de un medicamento para tratar la vulvodinia.
- 3.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dichos uno o más fibroblastos fetales se han obtenido a partir de tejido cutáneo fetal entero o fragmentos de tejido cutáneo fetal.
- 10 4.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dichos uno o más fibroblastos fetales se immortalizan.
- 5.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dichos uno o más fibroblastos fetales se obtienen de un banco de células o de una línea celular.
- 6.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dichas una o más proteínas de fibroblastos fetales se purifican.
- 15 7.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dicho lisato comprende uno o más componentes celulares.
- 8.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dichas una o más proteínas de fibroblastos fetales comprenden una o más citoquinas, enzimas, hormonas, proteínas estructurales de la matriz extracelular, neuropéptidos o antagonistas de neuropéptidos.
- 20 9.- La composición para usar según el uso de la reivindicación 8, en la que dichas citoquinas comprenden factores de crecimiento, interleuquinas, linfoquinas, monoquinas, interferones, factores estimuladores de colonias o quimioquinas o combinaciones y mezclas de los mismos.
- 25 10.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, que además comprende analgésicos, anestésicos, agentes antiinflamatorios, agentes antihistamínicos, antioxidantes, antiirritantes, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, conservantes, agentes estabilizantes de proteínas, inhibidores de proteasa, agentes protectores de la piel, protectores solares o combinaciones y mezclas de los mismos.
- 11.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dicha composición es adecuada para la administración tópica, en mucosa o vaginal.
- 30 12.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dicha composición es una pomada, loción, crema, espuma, mousse, pulverizador, aerosol, emulsión, nanoemulsión, máscara, microemulsión, gel, hidrogel, disolución, esponja o dispersión.
- 35 13.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dicha composición es una emulsión de agua en aceite o de aceite en agua o la composición es una crema basada en emulsión de agua en aceite o de aceite en agua.
- 40 14.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dichas una o más proteínas de fibroblastos fetales se incorporan en dicha composición en una concentración entre 0,001 y 95%, preferiblemente entre 0,01% y 5%, más preferiblemente entre 0,05% y 0,25%.
- 15.- La composición para usar según la reivindicación 1, en la que dicha lisis celular es inducida y no es espontánea.
- 45 16.- La composición para usar según la reivindicación 1, en la que dicha lisis celular se lleva a cabo de forma mecánica, física o química, o se lleva a cabo mediante uno o más ciclos de congelación-descongelación.
- 17.- La composición para usar según la reivindicación 1, en la que dicha lisis celular se lleva a cabo con entre 100 y 60.000.000 fibroblastos fetales suspendidos en 1 ml de un sistema acuoso, preferiblemente entre 10.000.000 y 20.000.00 células cutáneas fetales suspendidas en 1 ml de un sistema acuoso.
- 50 18.- La composición para usar según la reivindicación 17, en la que dicho sistema acuoso es un sistema de tampón fisiológico o un sistema de disolución salina tamponada con fosfato.
- 19.- La composición para usar según la reivindicación 17, en la que dicho sistema acuoso comprende además uno o más compuestos químicos estabilizantes de proteínas, inhibidores de proteasa, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antioxidantes, conservantes o combinaciones y mezclas de los mismos.

20.- La composición para usar según la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en la que dicha vulvodinia es la vestibulitis vulvar o el síndrome de vestibulitis vulvar.

5 21.- La composición para usar o el uso según la reivindicación 20, en la que el tratamiento de la vulvodinia comprende además el uso de corticoesteroides, estrógeno, progesterona, lidocaína, hidroclicloruro de pramoxina, capsaicina, isotretinoína, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , dapsona, aciclovir, antidepresivos tricíclicos o combinaciones o mezclas de los mismos.



Figura 1

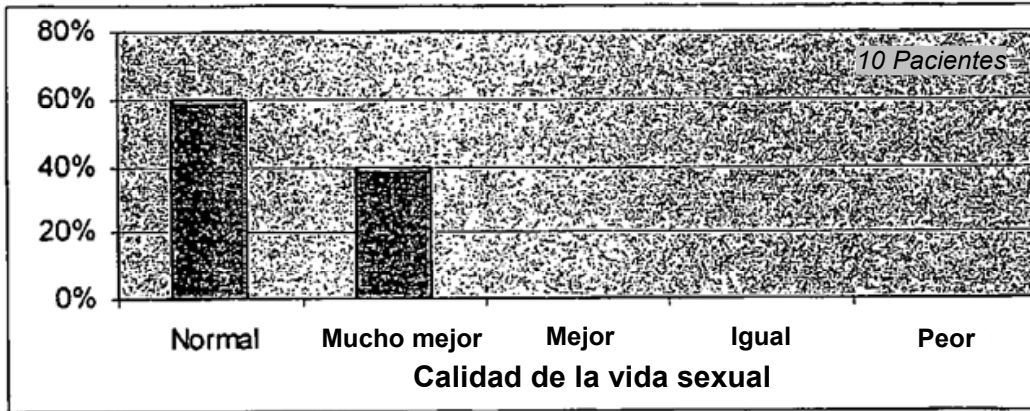


Figura 2

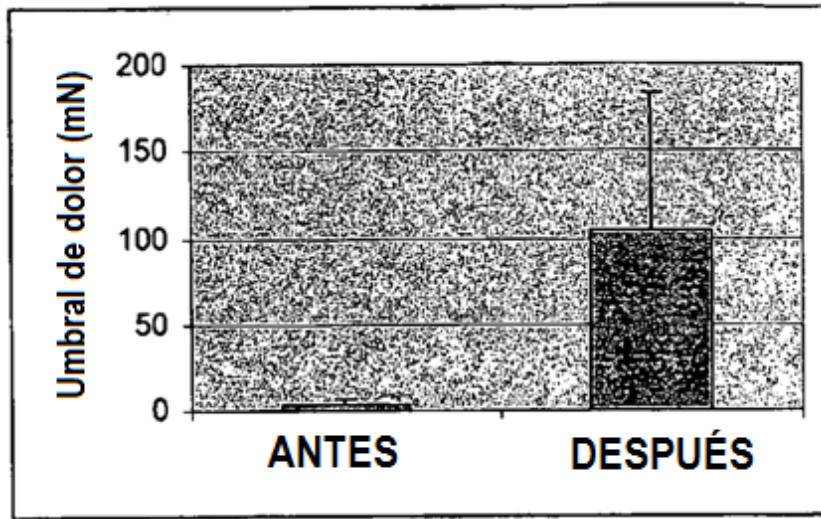


Figura 3

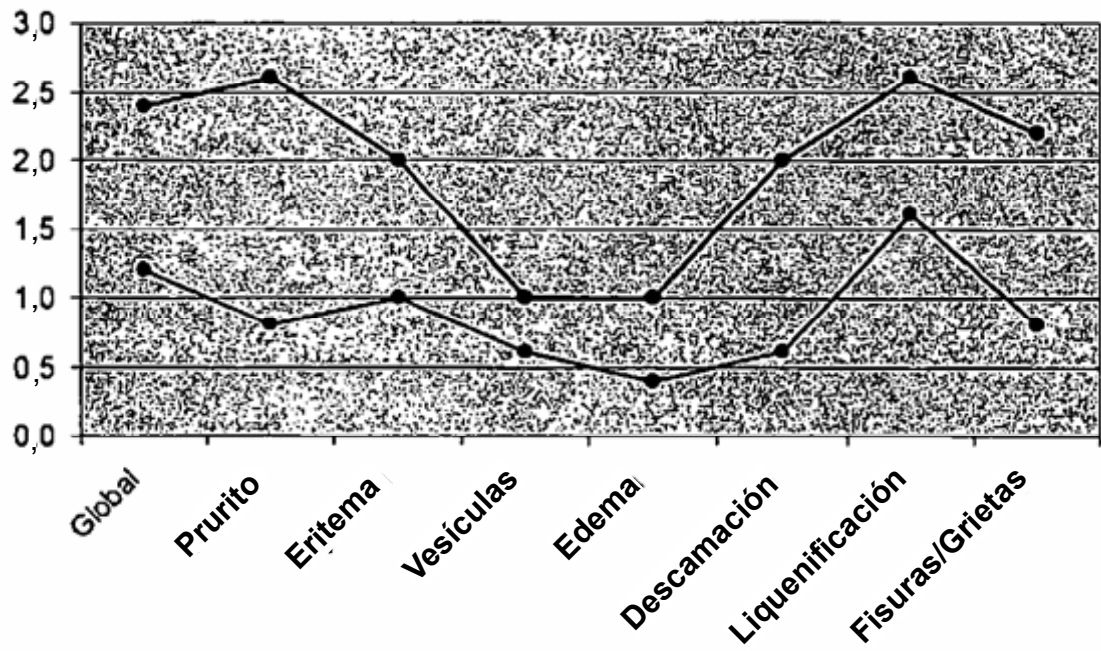
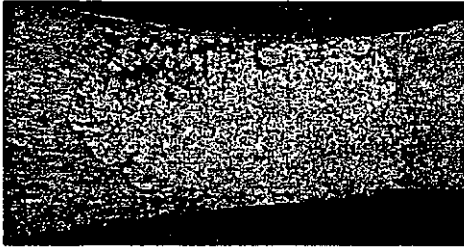


Figura 4

ANTES



DESPUÉS

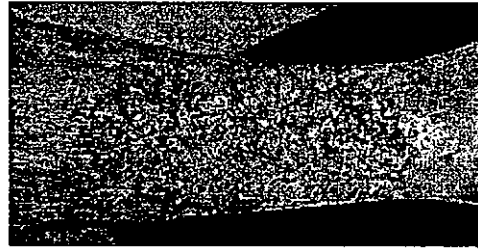


Figura 5

ANTES



DESPUÉS

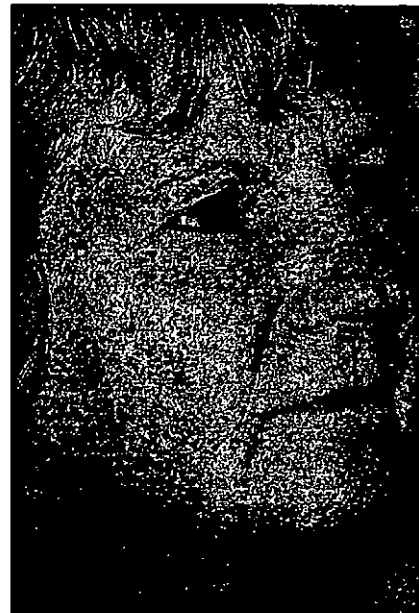
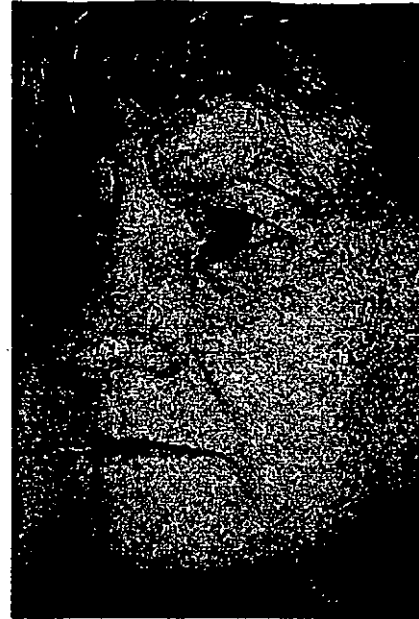


Figura 6

ANTES



DESPUÉS

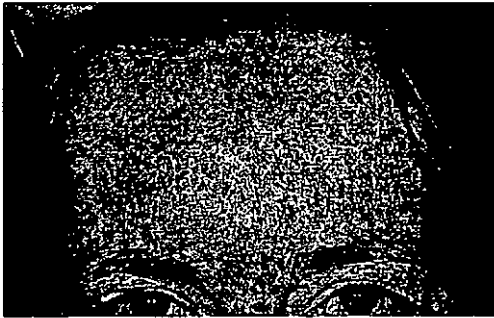
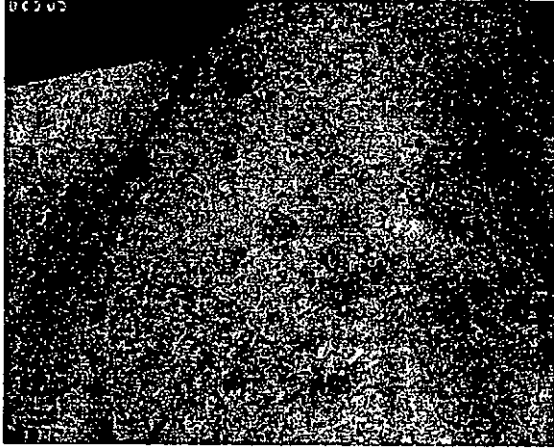


Figura 7

7

ANTES



DESPUÉS

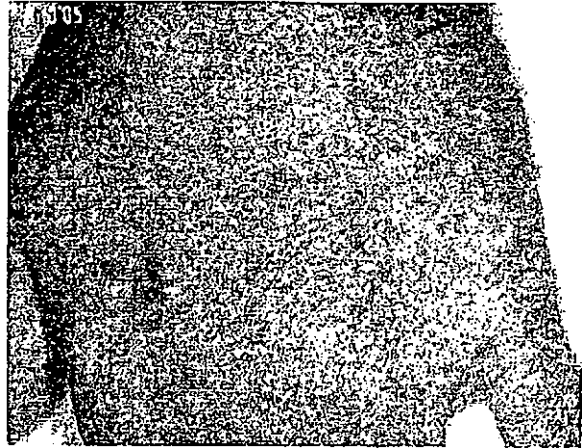


Figura 8

ANTES



DESPUÉS



Figura 9