

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 815**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)
A61K 35/36 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
A61L 27/60 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61K 35/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2005 E 05764678 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1718318**

54 Título: **Composición para cicatrización de heridas**

30 Prioridad:

13.02.2004 GB 0403220
13.02.2004 GB 0403226
25.03.2004 US 556194 P
25.03.2004 US 556155 P
30.11.2004 GB 0426252
01.12.2004 US 632425 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2014

73 Titular/es:

SMITH & NEPHEW ORTHOPAEDICS AG (100.0%)
Oberneuhofstrasse 10D
6340 Baar, CH

72 Inventor/es:

KEMP, PAUL;
TALAS, GYÖRGYI;
SUTHERLAND, JENNIFER;
BATTEN, MARGARET;
JOHNSON, PENELOPE ANN;
SHERING, ANDREW y
MCWHAN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 519 815 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para cicatrización de heridas

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para la regeneración de tejidos, particularmente para tratar lesiones cutáneas, tales como heridas. Las composiciones y métodos son útiles especialmente para ayudar en el proceso de cicatrización, particularmente en lesiones abiertas crónicas que son de cicatrización lenta o resistentes a la cicatrización.

La cicatrización de heridas abiertas que se extienden a través del epitelio germinal en un tejido por lo demás sano tiene lugar mediante el procedimiento descrito clásicamente como "segunda intención" que, después de la hemostasis inicial, implica una secuencia bien ordenada de inflamación, infiltración celular, angiogénesis, granulación y re-epitelialización. Como parte de la respuesta de cicatrización normal, es necesario que los fibroblastos residentes experimenten una serie de cambios fenotípicos, migrando al lugar de la herida, proliferando a continuación y después sintetizando y segregando moléculas de la matriz extracelular. *In vivo*, al menos una parte de los fibroblastos cambian entonces a un fenotipo miofibroblástico con el fin de facilitar la contracción de la herida.

In vitro, se han descrito varias poblaciones de fibroblastos mitóticos y post-mitóticos distinguibles fenotípicamente (Bayreuther *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5112-5116). La vía de diferenciación parece estar controlada, al menos en parte, por interacciones entre los fibroblastos y las proteínas de la matriz extracelular (abreviado generalmente como ECM por sus iniciales en inglés: extracellular matrix) presentes en el lugar de la herida. Los factores de crecimiento y las citocinas también ejercen sin ninguna duda una influencia importante, aunque sus efectos también parecen estar modulados por la exposición de los fibroblastos a proteínas de la ECM particulares. Entre las proteínas de la ECM que parecen tener un papel importante en la diferenciación de los fibroblastos están el fibrinógeno y la fibrina. Los fibroblastos interactúan específicamente con los restos "RGD" de la fibrina y el fibrinógeno a través de receptores de integrina $\alpha_v\beta_3$ aunque la respuesta celular es compleja y está modulada por otros factores. Estudios *in vitro* del efecto del pegamento de fibrina sobre los fibroblastos del ligamento periodontal humano han sugerido que la fibrina parece inhibir ligeramente la proliferación de los fibroblastos. También se ha informado de que la presencia de una matriz de fibrina aumenta la síntesis de colágeno por los fibroblastos inmovilizados (Neidert *et al.*, 2001, *Proceedings of the ASME Bioengineering Conference*, Kamm *et al.* [Eds] Vol. 50: 215-126).

También se sabe que los fibroblastos tienen un papel en la remodelación de los coágulos de fibrina. A medida que se emplazan las nuevas proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno de tipo I y III, fibronectina y vitronectina, la matriz de fibrina se descompone, predominantemente por la activación de la plasmina, enzima derivada del plasma. Esto está regulado por la activación (o inhibición) de su proenzima, el plasminógeno, mediante varios activadores e inhibidores del plasminógeno. *In vivo*, varias células infiltrantes, tales como neutrófilos y macrófagos, segregan el activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA), mientras que las células endoteliales son responsables principalmente de la producción del activador del plasminógeno tisular (tPA). Los fibroblastos también segregan tanto uPA como inhibidores del activador del plasminógeno, tales como el inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1). El equilibrio entre estos mediadores antagónicos es crucial para controlar la remodelación de la fibrina y la formación de la cicatriz. La expresión de los mediadores antagónicos está regulada en su desarrollo e igualmente está controlada por los componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento locales.

Para facilitar el movimiento a través de un coágulo de fibrina reticulada y de una red ajustada de la matriz extracelular, varias enzimas derivadas de los fibroblastos y del suero dividen una vía de migración. Estas incluyen la collagenasa intersticial (metaloproteinasa-1 de la matriz, MMP-1), gelatinasa (metaloproteinasa-2 de la matriz, MMP-2), estromelisina (metaloproteinasa-3 de la matriz, MMP-3) y los activadores del plasminógeno. Los factores quimiotácticos, tales como TGF- β y PDGF, pueden sobreregular la producción y secreción de estas enzimas.

Una vez que los fibroblastos migratorios alcanzan una herida, se vuelven gradualmente secretores y aumenta la síntesis de proteínas. El retículo endoplasmático previamente replegado y el aparato de Golgi se dispersan a través del citoplasma y se produce una pérdida de matriz que está compuesta principalmente de fibronectina y colágeno del tipo III. Finalmente, este fenotipo profibrótico asume el control, lo que se caracteriza por la abundancia de retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi, segregando colágeno recientemente sintetizado como respuesta al TGF- β altamente expresado. No obstante, el TGF- β no logra sobreregular la deposición más extensa del colágeno una vez que la matriz ha sido depositada. También se cree que la IL-4 segregada por los mastocitos induce un pequeño aumento en el colágeno de tipos I y III junto con la fibronectina. Los mastocitos además producen abundantemente tripsina (una serina esterasa), la cual se ha demostrado que sobre regula la proliferación de fibroblastos.

Estímulos tales como TGF- α , TGF- β y PDGF responsables de la proliferación de fibroblastos y síntesis de la matriz han sido ampliamente investigados *in vitro* (Derynck, 1988, *Cell* 54: 593-595; Ross & Raines, 1990, en: *Growth Factors: From genes to clinical applications*, Sara *et al.* [Eds], págs. 193-199, Raven Press, Nueva York; Sporn & Roberts, 1992, *J. Cell Biol.* 119: 1017-1021) y por manipulación *in vivo* de heridas (Sprugel *et al.*, 1987, *Am. J. Pathol.* 129: 601-613; Pierce *et al.*, 1991, *J. Cell Biochem.* 45: 319-326). Por otra parte, se ha demostrado que el

interferón γ tiene un efecto negativo sobre el potencial sintético y mitogénico de los fibroblastos *in vitro* e *in vivo* (Duncan & Berman, 1985, *J. Exp. Med.* 162: 516-527; Granstein *et al.*, 1987, *J. Clin. Invest.* 79: 1254-1258). Además, la misma matriz de colágeno puede suprimir estas actividades (Grinnel, 1994, *J. Cell. Biol.* 124: 401-404; Clark *et al.*, 1995, *J. Cell Sci.* 108: 1251-1261) mientras que la matriz de fibrina o de fibronectina no tiene efecto supresor o este es pequeño (Clark *et al.*, 1995 *supra*). Muchos fibroblastos experimentan apoptosis (muerte celular programada) en heridas cicatrizando durante 10 días marcando de esta forma la transición de un tejido de granulación rico en fibroblastos a un tejido cicatricial con una densidad celular reducida.

Cuando una herida ha destruido la capa germinal del epitelio, la deposición de colágeno por los fibroblastos infiltrantes y la re-epitelialización produce un grado de formación de cicatriz, con restauración incompleta de la función en lo que se refiere a la flexibilidad y la elasticidad de la dermis original y fallo en la regeneración de estructuras auxiliares tales como folículos capilares y glándulas sudoríparas.

Varios factores pueden afectar adversamente la tasa y la extensión de dicha cicatrización de las heridas, en particular, un suministro sanguíneo pobre. Un tejido pobremente perfundido, asociado a menudo con un retorno venoso deficiente y venas varicosas, enfermedad vascular periférica o diabetes, a menudo no logra cicatrizar satisfactoriamente lo que da lugar a úlceras crónicas, aunque los detalles de la patogénesis todavía no están claros. Las úlceras crónicas en las piernas son particularmente un problema significativo y creciente a nivel mundial.

Se han intentado varios enfoques para el tratamiento de las heridas. Se ha usado el injerto autógeno de piel para cerrar heridas abiertas, minimizar el riesgo de infección oportunista, acelerar la cicatrización y minimizar la formación de cicatrices. El trasplante de piel tiene limitaciones importantes, en particular el requisito de un lugar adecuado para la donación a partir del que se pueda tomar el injerto, lo que es un problema particular en los casos en los que las heridas son extensas (por ejemplo, con quemaduras). Además, los injertos tienen una tasa de éxito pequeña cuando la cicatrización de las heridas está en riesgo.

Con respecto a las úlceras crónicas en las piernas en particular, la introducción de terapia de compresión en combinación con apósitos húmedos ha sido el tratamiento terapéutico convencional.

Más recientemente han llegado a estar disponibles soluciones de ingeniería tisular. La investigación en medicina regenerativa ha demostrado que las células humanas tienen un potencial esencial para cicatrizar y regenerar el tejido dañado, especialmente cuando están preparadas por un medio que mimetiza cuidadosamente el estado fisiológico natural que se quiere tratar. La mayoría de esta investigación se ha centrado en la producción de los denominados "equivalentes tisulares" que tienen como objetivo proporcionar un reemplazo funcional temporal del tejido desaparecido y acelerar la cicatrización. Los equivalentes tisulares pueden ser equivalentes dérmicos o equivalentes de piel total, con el objetivo de proporcionar una cubierta eficaz de la herida tan pronto como sea posible. El desarrollo y producción de los equivalentes tisulares generalmente implican el aislamiento de células de piel de reemplazo, que se expanden y se siembran sobre o dentro de una estructura de soporte tal como una matriz tridimensional bio-reabsorbible o en un andamiaje con base de gel.

Se han usado varios materiales como matrices proteicas acelulares para aplicaciones en la cicatrización de heridas. Estos incluyen poliésteres sintéticos (ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), poliglactida (Dermagraft [MR], Smith & Nephew, descrito a continuación), polidioxano, polihidroxialconatos y derivados del ácido hialurónico), poliuretanos hidrófilos (polieterpoliéster, óxido de polietileno y etileno carboximetilcelulosa, y andamiajes con base de colágeno (material de colágeno y elastina reticulada (Matriderm [MR])), colágenos reticulados elaborados a partir de un material de colágeno bovino de tipo I soluble en ácido (tal como Vitaphore [MR]). Un enfoque alternativo es usar un derivado acelular de dermis alogénica humana, una matriz dérmica natural de la que se han eliminado células (tal como Alloderm [MR], LifeCell Corporation). Algunas preparaciones usan una estructura en capas organizada con el fin de mimetizar de forma más cercana la estructura y función de la dermis. Por ejemplo, se conoce una preparación que comprende una capa subyacente de colágeno bovino y glicosaminoglicanos de tiburón con una capa suprayacente de silicona (Integra [MR], Integra LifeSciences Corporation).

Otros enfoques para la cicatrización de heridas han implicado el uso de un sellante de fibrina, por ejemplo Tisseel [MR] (Baxter), Beriplast [MR] (Aventis), Quixil [MR] (Omxix Biopharmaceuticals), Haemaseel [MR] (Haemacure) y Crosseal [MR] (Omxix). Estos sellantes de fibrina se obtienen a partir de un crioprecipitado de plasmas combinados de donantes analizado frente a virus.

Los productos de fibrina se basan en el procedimiento de polimerización natural que se produce durante la cascada fisiológica de coagulación sanguínea en la que un precursor monomérico de fibrina, el fibrinógeno, reacciona ante la trombina activada con lo que da lugar a la producción de fibrina polimérica. La fibrina forma el andamiaje proteico componente de los coágulos sanguíneos al que se adhieren las plaquetas.

Se ha reconocido el papel de la fibrina como un portador celular conveniente y clínicamente aceptable que puede ser usado en aplicaciones de ingeniería tisular. Los productos disponibles comercialmente que usan sellantes de fibrina para la administración de células incluyen Bioseed [MR] (Biotissue Technologies). Varios grupos han sugerido el uso de sellantes de fibrina con propósitos de administración de células para el tratamiento de quemaduras (véase

Brown *et al.*, 1993, *Am. J. Pathol.* **142**: 273-283; Neidert *et al.*, 2001, *supra*; Tuan *et al.*, 1996, *Exp. Cell Res.* **223**: 127-134; y la solicitud de patente estadounidense N° 2003/0165482).

Se ha demostrado que las células dérmicas aplicadas exógenamente tienen efectos beneficiosos sobre la cicatrización de heridas, incluyendo un tiempo más corto para la cicatrización completa (Falanga & Sabolinski, 1999, *Wound Repair Regen* **7**: 210-207), la administración de factores de crecimiento activos a la herida (Naughton *et al.*, 1997, *Artif. Organs* **21**: 1203-1210), un potencial reducido de repetición de la lesión (Gentzkow *et al.*, 1996, *Diabetes Care* **19**: 350-354) y un dolor reducido (Muhart *et al.*, 1999, *Arch. Dermatol.* **135**: 913-918).

Las combinaciones conocidas de matrices de proteínas y células dérmicas con aplicaciones en cicatrización de heridas incluyen una preparación denominada Dermagraft [MR] (Smith & Nephew) que comprende fibroblastos primarios de prepucio humano criopreservados sembrados sobre un andamiaje de un poliéster del ácido glicólico-láctico (poliglactida) bioabsorbible (Naughton *et al.*, 1997, *supra*, US 4.963.489). Se deja que los fibroblastos proliferen en el andamiaje segregando proteínas de la matriz extracelular y factores de crecimiento y citocinas. La preparación madura se envasa en sulfóxido de dimetilo al 10% y suero bovino como criopreservante para permitir el almacenamiento del producto por congelación antes de su uso. Las desventajas de este enfoque incluyen la dificultad en la manipulación del producto durante la aplicación a la herida (tales como úlceras) y la necesidad de almacenar y transportar el producto a temperaturas muy bajas (-70°C) y el uso de procedimientos cuidadosos de descongelación con el fin de asegurar la viabilidad de las células (véase la patente WO 87/06120).

Se conocen varias combinaciones de matrices basadas en colágeno y células vivas. Apligraf [MR] (Organogenesis, Inc.) es una estructura bicapa que comprende una capa ("dérmica") de un andamiaje de colágeno bovino que soporta fibroblastos humanos vivos y una capa superior ("epidérmica") que comprende queratinocitos humanos sobre un andamiaje de colágeno (Falanga & Sabolinski, 1999, *supra*; WO 99/63.051). La preparación se suministra como un disco circular de aproximadamente 75 mm de diámetro y 0,75 mm de grosor sobre una membrana de policarbonato inerte. Apligraf [MR] se envasa individualmente para su uso y tiene una durabilidad de 5 días. Se mantiene en un nutriente rico en agarosa con una atmósfera de CO₂ al 10%/aire y se transporta y almacena a temperatura ambiente (20°C a 31°C; 68°F a 88°F). La extracción del producto de la placa de almacenamiento y de la membrana de policarbonato implica separar el borde del Apligraf [MR] usando fórceps estériles. Los problemas asociados con este método incluyen el plegado excesivo que puede hacer que la aplicación cercana y precisa de la preparación a la herida sea difícil y que requiera mucho tiempo.

Un producto similar (Orcel [MR]; Ortec International Inc.) se describe en el documento US6.039.760. Orcel [MR] es una estructura bicapa de colágeno bovino con fibroblastos y queratinocitos. La preparación se envasa entre 2 piezas no adherentes de malla que están coloreadas de forma diferente para distinguir entre ambos lados. El dispositivo se envasa a continuación en una bandeja plástica que contiene un medio para mantener la viabilidad de las células durante el almacenamiento y el transporte, lo cual se empaqueta adicionalmente en bolsas con envases de refrigeración para mantener una temperatura de 11°C a 19°C durante 72 horas.

Otro ejemplo de un equivalente tisular que intenta reproducir un ordenamiento de fibroblastos en un matriz de proteína que soporta una capa suprayacente de queratinocitos, similar al de la dermis, se describe en Meana *et al.* (1998, *Burns*, **24**: 621-630). Rama *et al.* (2001, *Transplantation* **72**: 1478-1485) describe un método para cultivar células madre límbicas autógenas sobre un sustrato de gel de fibrina para injertarlas en la córnea contralateral.

La solicitud de patente estadounidense N° 20030165482 describe una preparación para la cicatrización de heridas (Allox [MR], Modex Therapeutiques SA) que comprende fibroblastos humanos alogénicos de crecimiento detenido y queratinocitos aplicados sobre una herida en una pasta viscosa de fibrinógeno (Tisseel [MR]) a la que se ha añadido trombina de forma que la escisión del fibrinógeno y la polimerización de la fibrina se producen *in situ*. Alternativamente, los componentes líquidos separados se pulverizan sobre la herida para que solidifiquen *in situ* al mezclarse.

La Solicitud de Patente Europea N° EP1375647 describe una dermis artificial obtenida a partir de plasma con plaquetas y fibroblastos humanos. Se declara que esta dermis artificial produce el crecimiento de los queratinocitos sembrados sobre su superficie para proporcionar una piel artificial para el tratamiento de quemaduras o úlceras cutáneas crónicas.

La Solicitud de Patente Internacional anterior N° WO02/072113 de Intercytex Limited, describe una composición que comprende un material formador de matriz, tal como fibrinógeno/trombina, y células de fibroblastos capaz de reducir la respuesta inflamatoria producida por la cicatrización, para usarla en la reducción de la fibrosis y la formación de tejido de cicatriz durante la cicatrización de las heridas cutáneas. Se pretende que la composición se use durante varias horas, o incluso durante un tiempo menor, después de la formación de la herida, preferiblemente entre 2-36 horas.

La presente invención proporciona una preparación alternativa para la cicatrización de heridas y productos y métodos asociados para abordar los problemas asociados con los productos y métodos de la técnica anterior.

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para producir una composición para cicatrización de heridas que comprende células de fibroblastos vivos en una matriz de soporte de fibrina sólida o semisólida, en la que las células no son senescentes y tienen un fenotipo de cicatrización de heridas, y en el que la composición es monocapa, comprendiendo el método las etapas de:

- 5 (i) formar la matriz de soporte que contiene las células vivas en la que las células están en suspensión en la matriz; donde la matriz de fibrina tiene una concentración de fibrina en el intervalo de 3 a 12 mg·mL⁻¹ y donde la matriz de soporte está formada con una densidad celular de 450 a 2.500 células por mm²;
- (ii) incubar las células en la matriz de soporte durante 16 a 24 horas a aproximadamente 37°C para permitir el desarrollo del fenotipo de cicatrización de heridas;
- 10 (iii) envasar la composición en un contenedor adecuado para almacenar la composición; y
- (iv) almacenar la composición después de incubación y antes de usarla durante hasta aproximadamente 40 días, a una temperatura de 2°C a 8°C, manteniendo a la vez el fenotipo de cicatrización de heridas.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición para cicatrización de heridas que comprende células de fibroblastos dérmicos humanos vivos en suspensión en una matriz de soporte de fibrina, sólida o semisólida, no pirogénica, monocapa, estéril, formada por la polimerización del fibrinógeno mediada por trombina, en la que la matriz de fibrina tiene una concentración de fibrina en el intervalo de 3 a 12 mg·mL⁻¹, donde la matriz de soporte está formada con una densidad celular de 450 a 2.500 células por mm², y donde la composición ha sido incubada durante 16 a 24 horas a aproximadamente 37°C, de forma que las células no son senescentes y tienen un fenotipo de cicatrización de heridas, en el que la composición se envasa después del almacenamiento en un contenedor adecuado para almacenar la composición.

La invención proporciona un enfoque para el tratamiento de las heridas crónicas no basado en proporcionar un equivalente tisular inmediatamente funcional, sino en administrar células en una matriz de soporte (que también se podría denominar matriz de maduración o matriz de desarrollo; por ejemplo una matriz biocompatible), con potencial para promover y acelerar el proceso de cicatrización. Aunque el desarrollo de un equivalente cutáneo viable (por ejemplo un equivalente de tejido dérmico cultivado que comprende fibroblastos, matriz extracelular y queratinocitos suprayacentes organizados en estructuras funcional y anatómicamente adecuadas) sigue siendo un objetivo que merece la pena, hasta ahora esto no se ha podido conseguir. Sin embargo, en muchas situaciones, la presente invención demuestra que dicho enfoque puede ser innecesariamente complejo y que una solución más sencilla, la de proporcionar una sola capa de células en la etapa apropiada de desarrollo y que presenta un fenotipo particular en una composición para cicatrización de heridas para la aplicación rápida, conveniente y precisa en las heridas, es notablemente eficaz. Las células usadas en la presente invención desarrollan de forma sorprendentemente rápida un “fenotipo de cicatrización de heridas” para estimular la cicatrización inmediata de la herida. Se cree que el fenotipo de cicatrización de heridas representa el fenotipo óptimo para acelerar o auxiliar en la cicatrización de la herida. La invención permite la administración de dichas células (en la composición) a una herida, preferiblemente de una forma que sea consistente con el mantenimiento del fenotipo de cicatrización de heridas.

Si las células tienen o no un fenotipo de cicatrización de heridas puede analizarse aplicando la composición a una herida (como se ha definido en la presente memoria) y observar si se acelera o estimula la cicatrización de la herida o no.

Las heridas a las que se puede aplicar la composición para cicatrización de heridas incluyen heridas tales como una úlcera, tal como una úlcera venosa o una úlcera diabética, una escara por presión, una quemadura o una herida por irritación iatrogénica. La composición es particularmente útil para tratar heridas recalcitrantes, es decir heridas que no cicatrizan en tres meses usando un tratamiento estándar.

El término “monocapa” indica que la composición tiene solo una capa que contiene células en una matriz de soporte, es decir no es un “equivalente cutáneo” multicapa con múltiples capas de (diferentes) células. Sin embargo, la invención también incluye composiciones que tienen capas no celulares adicionales así como composiciones que tienen capas apiladas que comprenden esencialmente capas simples uniformes.

La composición se incuba durante 16 horas a 24 horas. La incubación es preferiblemente *in vitro* pero también puede hacerse *in situ* (por ejemplo, con la composición aplicada a una herida).

En un modo de realización los inventores han encontrado que tomando células tales como fibroblastos dérmicos humanos explantados, moldeando (o sembrando) las células en una matriz tal como una matriz con base proteica e incubando a continuación esta mezcla durante hasta 96 horas, por ejemplo, se produce un fenotipo de cicatrización de heridas que es particularmente beneficioso para usarlo en aplicaciones de cicatrización de heridas. Se ha observado que dichas células están predominantemente en una fase proliferativa en el cultivo (promovida mediante una densidad de siembra baja y evitando inhibición por contacto).

Los inventores han encontrado que en condiciones normales de cultivo, por ejemplo, un cultivo líquido de fibroblastos dérmicos humanos incubados en un medio de cultivo estándar a 37°C, el desarrollo de un fenotipo de

cicatrización de heridas puede necesitar generalmente de 2 a 3 días. Sin embargo, la incubación de dichos fibroblastos en un medio adecuado, tal como una matriz de soporte y/o una herida disminuye el proceso de desarrollo, de forma que antes de 24 horas las células pueden haber entrado o alcanzado el fenotipo de cicatrización de heridas. Por lo tanto, la incubación de las células en una matriz de soporte adecuada y/o en heridas, produce un tiempo de desarrollo más corto para alcanzar un fenotipo de cicatrización de heridas que las condiciones de cultivo estándar (por ejemplo, líquido).

La composición se incuba a una temperatura de aproximadamente 37°C. Si la incubación tiene lugar a una temperatura menor, las células vivas se desarrollarán a una velocidad más lenta y puede ser necesario alargar el tiempo de incubación.

Preferiblemente, la composición excluye células inactivadas mitóticamente (por ejemplo, células inactivadas mitóticamente mediante la administración de mitomicina C y otros inhibidores mitóticos con base química, irradiación con rayos γ , irradiación con rayos X o irradiación con luz UV, como se describe por ejemplo en el documento US2003/0165482).

La composición puede almacenarse después de la incubación (es decir, tiene una durabilidad) durante hasta aproximadamente 40 días, preferiblemente hasta 28 días o 21 días o 19 días y de forma más preferible aproximadamente de 7 a 14 días o aproximadamente de 7 a 11 días, a una temperatura de 2°C a 8°C, por ejemplo de 3°C a 5°C, preferiblemente aproximadamente 4°C, manteniendo a la vez su capacidad para cicatrizar heridas. Por lo tanto, la composición no requiere congelación como algunas composiciones para cicatrización de heridas de la técnica anterior. La presente composición preferiblemente no contiene ninguna sustancia añadida como crioprotector o crioprotector (tal como glicerol y/o albúmina de suero humano).

Después de que las células de la composición han sido incubadas para alcanzar o aproximarse a la fase de fenotipo de cicatrización de heridas, la composición puede preferiblemente almacenarse convenientemente a aproximadamente 4°C durante hasta 40 días, y sin duda de 7 a 14 días, antes de usarla sin ninguna pérdida significativa de viabilidad o cambio del fenotipo. Esto tiene ventajas prácticas significativas en cuanto a que proporciona no solo un producto eficaz que comprende células con un fenotipo de cicatrización de heridas (por ejemplo, células que son óptimamente adecuadas para la secreción de la matriz extracelular con un mínimo de fibrinólisis no adecuada), sino que también proporciona una durabilidad relativamente larga en las condiciones de refrigeración estándar generalmente disponibles. La capacidad para transportar dichos productos a aproximadamente 4°C también simplifica de forma importante el transporte. Mantener una cadena de frío de 2° a 8°C es considerablemente más sencillo y más barato que el transporte a -70°C, como es necesario generalmente para células vivas.

Las células son preferiblemente de mamífero, por ejemplo humanas.

Las células de la presente invención pueden incluir fibroblastos, queratinocitos, células del estrato germinativo y combinaciones o mezclas de dichas células. Sin embargo, en un modo de realización preferido, las células de la composición pueden excluir esencialmente los queratinocitos. Las células pueden aislarse a partir de cualquier fuente de un mamífero, y preferiblemente son de humano. Las células son preferiblemente alogénicas, aunque también pueden usarse células autógenas y/o xenógenas. Las células pueden ser esencialmente de un único tipo, por ejemplo 90% a 100%, preferiblemente 95% a 99,5% y más preferiblemente 97,5% a 99% de un tipo. En un modo de realización preferido, las células son esencialmente fibroblastos, por ejemplo 90% a 100%, preferiblemente 95% a 99,5% y más preferiblemente 97,5% a 99% fibroblastos. Los fibroblastos pueden ser fibroblastos dérmicos, preferiblemente fibroblastos dérmicos humanos. Un modo de realización preferido comprende fibroblastos alogénicos humanos obtenidos del prepucio.

Si es necesario para la elaboración, las células pueden ser descongeladas, recuperadas, extendidas en cultivo (por ejemplo, durante aproximadamente una semana) o hasta que alcanzan confluencia, y se pueden volver a poner en suspensión en volúmenes y densidades adecuados según sea necesario. Aunque se prefieren células de pase temprano, también se pueden usar células de pase tardío. Preferiblemente las células pueden someterse a menos de 20 pasos, más preferiblemente menos de 15 pasos, lo más preferiblemente menos de 10 pasos, por ejemplo 7 pasos. Después de descongelarlas para usarlas en la presente invención, las células pueden ser incubadas adicionalmente como se ha descrito.

Para los objetivos de la presente invención, el día 0 es el día en el que las células se han incubado y comienza el desarrollo y alcanzarán el fenotipo de cicatrización de heridas en el intervalo temporal descrito anteriormente (por ejemplo, hasta 4 días, o 96 horas después del día 0).

Las células pueden ser activas desde un punto de vista de síntesis o ser capaces de volverse rápidamente activas desde un punto de vista de síntesis (por ejemplo, después del almacenamiento).

Las células son preferiblemente no proliferantes. De forma óptima, las células deben estar en una fase sintética de desarrollo (o madurez), mejor que en una fase proliferativa. La proliferación puede ser útil para aumentar el número de células, pero retrasa la importante síntesis de las proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno de los

tipos I y III, fibronectina y vitronectina. Por lo tanto, las células pueden estar sintetizando proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno de tipos I y III, fibronectina y vitronectina. Las células que se han vuelto senescentes no contribuyen a la cicatrización de las heridas y por lo tanto sirven poco para objetivos como el terapéutico.

- 5 Las células pueden ponerse en suspensión en la matriz, preferiblemente de forma esencialmente uniforme en la matriz.

La matriz puede ser de base proteica, por ejemplo tener una concentración de proteínas en el intervalo de aproximadamente 3 a 12 mg·mL⁻¹. Por ejemplo, la matriz es preferiblemente una sustancia coagulable o gelificante tal como fibrina, colágeno, fibronectina, vitronectina, alginato, agar, colágeno, PVA, ácido hialurónico, almidones modificados, carragenanos, algarroba, gelatina, pectina o un agente gelificante.

- 10

La matriz es preferiblemente no pirogénica y/o estéril.

En un modo de realización preferido, la matriz es una matriz de fibrina. La fibrina puede tener una concentración en la composición en el intervalo de 3 a 12 mg·mL⁻¹, por ejemplo de 7 a 12 mg·mL⁻¹ o 3 a 5 mg·mL⁻¹. La matriz de fibrina se forma preferiblemente mediante la polimerización del fibrinógeno mediada por trombina.

- 15 La matriz es preferiblemente sólida o semisólida. La matriz de la composición está "pre-moldeada" en el sentido de que se proporciona en forma sólida o semisólida (tal como un gel). La matriz puede ser insoluble. Lo más preferiblemente, las células se moldean en la matriz antes del desarrollo de un fenotipo de cicatrización de heridas.

La velocidad de fibrinólisis que se produce en la composición puede ser un factor a tener en cuenta con una composición basada en una matriz de fibrina. Como se ha descrito anteriormente, la fibrinólisis es una parte normal del proceso de cicatrización de las heridas, por el que la matriz de fibrina es reemplazada gradualmente por otras proteínas de la matriz extracelular. Sin embargo, si la fibrinólisis se produce demasiado pronto o demasiado rápidamente, el gel para cicatrización de heridas se rompe antes de que se haya producido la útil deposición del colágeno. La expresión en los fibroblastos de los factores pro-fibrinolíticos tales como el activador del plasminógeno tipo urocinasa está regulada desde el punto de vista del desarrollo y, por lo tanto, el fenotipo de los fibroblastos cuando se han incluido en la composición es importante si se quiere evitar la fibrinólisis prematura.

- 20
- 25

La composición para cicatrización de heridas puede comprender además un inhibidor de la proteasa adecuado para evitar la ruptura de la matriz. El inhibidor puede ser un inhibidor de la serina proteasa, más preferiblemente uno o más elegidos entre la lista que consiste en aprotinina, ácido e-aminocaproico y ácido tranexámico. Preferiblemente, de forma especial cuando la concentración de la proteína está en el intervalo de 7 a 12 mg·mL⁻¹, el inhibidor de la proteasa es la aprotinina. Alternativamente, de forma especial cuando la concentración de la proteína está en el intervalo de 3 a 5 mg·mL⁻¹, el inhibidor de la proteína puede ser el ácido tranexámico.

- 30

La composición puede incubarse en un medio rico en proteína.

Si la composición es suficientemente sólida, se puede proporcionar en cualquier forma y tamaño adecuado para ajustarse a las heridas para las que está diseñado su uso. Preferiblemente, la composición tiene esencialmente forma de disco. La composición puede tener un grosor de aproximadamente 8 mm o menos, preferiblemente 5 mm o menos. El grosor de la matriz determinará normalmente el grosor de la composición.

- 35

La composición para cicatrización de heridas puede comprender aproximadamente 450 a 2.500 células por mm², aproximadamente 500 a 1.500 células por mm², aproximadamente 750 a 2.000 células por mm², o aproximadamente 900 a 1.700 células por mm², tal como aproximadamente 1.450 a 1.550 células por mm² y preferiblemente aproximadamente 1.500 células por mm², o por ejemplo aproximadamente 450 a 550 células por mm² y preferiblemente aproximadamente 500 células por mm², medidas por unidad de área. Densidades celulares menores que las indicadas pueden producir una viabilidad celular pobre. Densidades celulares mayores pueden producir inhibición de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y progresión hacia un fenotipo celular senescente. En el intervalo de densidades celulares proporcionado anteriormente, se han desarrollado modos de realización específicos de la invención que usan aproximadamente 500 células por mm² y aproximadamente 1.500 células por mm².

- 40
- 45

En un modo de realización preferido, la composición para cicatrización de heridas comprende células que son fibroblastos dérmicos humanos en una matriz de soporte de fibrina estéril, no pirogénica formada por la polimerización del fibrinógeno mediada por trombina, y en la que la composición ha sido incubada durante 16 a 24 horas a aproximadamente 37°C.

- 50

La composición puede envasarse en un contenedor adecuado para el transporte de la composición (por ejemplo, durante el almacenamiento de la composición) y/o para aplicar de forma tópica la composición a la superficie de la piel. El contenedor puede comprender una bolsa flexible que consiste en dos hojas de material flexible impermeable sellado periféricamente para proporcionar un medio de contención para la composición, comprendiendo la bolsa una primera superficie interna a la que la composición se adhiere con un nivel de adhesión mayor que el nivel entre la composición y una segunda superficie interna de la bolsa, pero menor que el nivel entre la composición y la

- 55

superficie de la piel, de forma que durante el uso la bolsa puede abrirse separando las hojas y la composición puede manipularse convenientemente y aplicarse directamente a la superficie de la piel sin ningún requisito adicional para que la composición sea tocada directamente por ningún otro medio antes de su aplicación. Por ejemplo, el contenedor puede ser un "material para bolsa pelable resistente a los disolventes" de Oliver [MR] Products Company (Nº de Producto Q15/48BF1).

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición para cicatrización de heridas como se ha descrito en la presente memoria para usarla como medicamento. Por ejemplo, la composición puede ser para usarla como un medicamento en el tratamiento de una lesión de la piel. La composición como medicamento puede ser usada para aplicación tópica a una lesión de la piel o herida como se ha descrito en la presente memoria.

La composición para cicatrización de heridas como se ha definido en la presente memoria se puede elaborar mediante un método que comprende las etapas de:

- poner en suspensión células vivas en una disolución que comprende un agente de polimerización y/o un monómero capaz de ser polimerizado por el agente de polimerización en una matriz;
- formar una matriz de soporte monocapa que comprende las células por polimerización del monómero con el agente de polimerización; e
- incubar la matriz en condiciones (por ejemplo condiciones como se han definido en la presente memoria, tales como condiciones de tiempo y temperatura) que permitan el desarrollo de un fenotipo de cicatrización de heridas en las células, formando de este modo una composición para cicatrización de heridas.

Si, por ejemplo, la composición comprende un monómero sin agente de polimerización o un agente de polimerización sin monómero, la matriz se puede formar añadiendo monómero o agente de polimerización, según sea necesario, a la disolución de forma que tanto el monómero como el agente de polimerización estén presentes en concentraciones suficientes para que se produzca la polimerización.

La composición para cicatrización de heridas como se ha definido en la presente memoria puede elaborarse mediante un método que comprende las etapas de formar una matriz de soporte monocapa polimerizando un monómero polimerizable con un agente de polimerización, moldear las células vivas en la matriz de soporte e incubar la matriz en condiciones (por ejemplo condiciones como se han definido en la presente memoria, tales como condiciones de tiempo y temperatura) que permitan el desarrollo de un fenotipo de cicatrización de heridas en las células, formando de este modo una composición para cicatrización de heridas.

Un método para elaborar una composición para cicatrización de heridas como se ha descrito en la presente memoria puede comprender las etapas de poner en suspensión células vivas de mamífero en una disolución que comprende un monómero de proteína capaz de polimerizarse en una matriz insoluble, añadir un agente capaz de promover dicha polimerización (es decir, un agente de polimerización) y permitir que se produzca la polimerización en un molde de forma que la composición polimerizada sólida pueda retirarse del molde y ser envasada lista para la administración tópica a un paciente. Las células son preferiblemente como se han descrito en la presente memoria.

El monómero puede ser fibrinógeno y el agente de polimerización puede ser trombina. Alternativamente, el agente de polimerización pueden ser factores de coagulación dependientes de la vitamina K, serina proteasas de veneno (por ejemplo, Crotalax, Batroxobin, Gabonase, Okinaxobin, Reptilase, Calobin y Fibrozyne) u otros agentes con actividad de escisión del fibrinógeno similar a la trombina.

Las células pueden tener un fenotipo de cicatrización de heridas como se ha descrito en la presente memoria antes de ser puestas en suspensión en el monómero, o pueden adoptar o desarrollar dicho fenotipo durante la incubación en los intervalos de tiempo descritos en la presente memoria (por ejemplo, de 0 horas a 96 horas después de ponerlas en suspensión).

La polimerización se puede producir en un molde.

Los métodos pueden incluir etapas para añadir componentes adicionales como se han descrito en la presente memoria a la composición.

El método de la invención puede comprender la etapa adicional de envasar la composición para cicatrización de heridas en un contenedor para transportar la composición y/o para aplicar de forma tópica la composición a una superficie de la piel de un paciente.

El contenedor para ser usado en la invención proporciona un medio conveniente para el almacenamiento, la administración y la aplicación de cualquier forma de materiales sólidos o especialmente semisólidos, especialmente los previstos para la aplicación tópica a superficies corporales. Preferiblemente, dichos materiales son de naturaleza semisólida o de gel, de forma que la manipulación física sin el contenedor sería difícil. La adherencia preferencial del material a un elemento del contenedor, con la facilidad de transferencia acto seguido a la piel o a otra superficie corporal, proporciona una ventaja considerable. En particular, dicho material puede ser cortado en el tamaño

requerido antes de la aplicación al área prevista. En el caso de composiciones para cicatrización de heridas como se han descrito en la presente memoria, esto es una ventaja particular.

En un modo de realización preferido, el contenedor comprende una hoja metálica, plástico laminado o metalizado. En un modo de realización preferido comprende un área transparente que permite la inspección visual de su contenido.

Preferiblemente, las superficies internas del contenedor y sus contenidos son estériles.

En un modo de realización preferido, la primera superficie interna de la bolsa está modificada para aumentar la adherencia de la composición a ella. En un modo de realización esto comprende la aplicación de un revestimiento a la primera superficie interna. Preferiblemente, el revestimiento se elige entre la lista que consiste en: un polímero, un termoplástico, un plástico termoendurecible, una proteína, un aminoácido y un carbohidrato.

Alternativamente, la primera superficie interna está modificada por rugosificación para aumentar la adherencia de la composición a ella. Como se usa en la presente memoria, el término "rugosificación" incluye cualquier modificación física de la superficie prevista para aumentar la adherencia, tal como gofrado, rayado, abrasión o arañado fino, o rugosificación química por medio de ataque químico, erosión o tratamiento ácido o básico. Se describen otros medios de modificar las propiedades de energía superficial de la superficie con el fin de aumentar o modular el grado de adherencia del producto sólido o semisólido. Dichos medios incluyen revestir la primera superficie interna de la bolsa. Preferiblemente, dicho revestimiento se elige entre la lista que consiste en un polímero, termoplástico, plástico termoendurecible, proteína, aminoácido o carbohidrato.

En un modo de realización particularmente preferido, la primera superficie interna se modifica por medio de un revestimiento discontinuo en forma de áreas o puntos elevados que tienen el efecto de proporcionar una superficie rugosificada.

A continuación se describirán ejemplos específicos de la invención con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- la figura 1 es un diagrama de flujo que resume el procedimiento de elaborar una composición para cicatrización de heridas según los modos de realización preferidos de la invención; y
- la figura 2 muestra el envasado, manipulación y aplicación de una composición para cicatrización de heridas preferida producida según el procedimiento mostrado en la figura 1. A: muestra una matriz (o gel solidificado) que se adhiere preferentemente a una superficie interna modificada de una o dos hojas de plástico metalizado de una bolsa contenedora. B: muestra el uso de una de las hojas del contenedor para aplicar el gel de la composición para cicatrización de heridas a la piel. Nótese que la hoja puede ser usada para soportar el gel mientras que ambos se cortan con la forma y tamaño apropiado. C: muestra la composición para cicatrización de heridas en su lugar.

El procedimiento de elaborar composiciones de la invención preferidas se resume en la figura 1. Como se ha descrito anteriormente, se pueden usar componentes o métodos alternativos en lugar de los descritos aquí.

En principio, la composición comprende dos componentes que se moldean juntos. El primer componente comprende una disolución de fibrinógeno junto con uno o más inhibidores de la proteasa para evitar la proteólisis no deseada por contaminantes de proteasa y la ruptura prematura de la matriz por células durante el almacenamiento. En particular, los contaminantes pueden incluir la enzima naturalmente fibrinolítica plasmina, o su precursor el plasminógeno. Los inhibidores de la serina proteasa tales como la aprotinina, el ácido ϵ -aminocaproico o su análogo el ácido tranexámico se usan frecuentemente con el fin de inhibir la plasmina o evitar su activación. A esta disolución de fibrinógeno se le añade una suspensión de células vivas en un medio adecuado o una disolución tampón (una "suspensión celular de trabajo").

El segundo componente comprende una disolución de trombina (una enzima que actúa naturalmente sobre el fibrinógeno), iones de calcio (un cofactor necesario) y un medio adecuado para el cultivo de células vivas. Un factor de coagulación adicional, Factor XIII, también es activado por la trombina en presencia de iones de calcio. El Factor XIII activado promueve la polimerización de la fibrina monomérica (escindida del fibrinógeno por la trombina) en un andamiaje proteico insoluble tridimensional.

Con el fin de moldear un gel (es decir, una matriz en forma de un gel), se combinan estos dos componentes y, mientras que están todavía líquidos, se vierten en un molde adecuado pre-revestido. Aunque generalmente son circulares, los geles se pueden moldear en cualquier forma deseada. Para algunas aplicaciones, otras formas pueden ser más adecuadas. En particular, geles esencialmente o básicamente rectangulares o elípticos pueden ser más convenientes para heridas más grandes.

La escisión enzimática del fibrinógeno en monómeros de fibrina y la polimerización de estos monómeros produce la solidificación del líquido en un gel semisólido en el que se ponen en suspensión las células vivas. Para muchas aplicaciones, este gel se mantiene durante un periodo de aproximadamente 24 horas en condiciones adecuadas para el crecimiento celular, división y secreción de proteínas de la matriz extracelular, y otras proteínas tales como

factores de crecimiento. Después del desarrollo (o maduración), el gel moldeado se retira del molde de moldeo y se coloca directamente en un envase estéril (cuyo término se considera en la presente memoria que tiene el mismo significado que "contenedor"). Una pequeña cantidad de medio, por ejemplo un medio tampón, se añade a cada envase para mantener el producto durante el almacenamiento y el transporte y los envases se sellan. Durante el almacenamiento y el transporte los envases se mantienen a una temperatura de 2°C a 8°C.

En dos modos de realización preferidos, denominados Protoderm 500 y Protoderm 1500, la composición comprende células a una densidad de aproximadamente 500 células por mm² y aproximadamente 1.500 células por mm², respectivamente.

Las ventajas de dicho producto sobre las alternativas actualmente disponibles incluyen las siguientes. El uso de una proteína sellante como andamiaje o matriz de soporte permite la administración tópica conveniente de las células a la herida. El gel pre-moldeado permite la aplicación conveniente y precisa de células regenerativas a la superficie de la herida con control de la distribución y densidad de las células aplicadas. La elaboración y transporte de otros equivalentes tisulares puede tomar aproximadamente 3 semanas para la matriz sola, mientras que el producto de la presente invención puede elaborarse en 10 días, o incluso en tan poco tiempo como 2 días si hay disponibles suficientes células en crecimiento. Estos factores se combinan para proporcionar ventajas económicas, de forma que la elaboración y producción es más rentable que muchos otros productos disponibles comercialmente.

Como se describe a continuación, el producto de la invención cuando se envasa también proporciona un sistema de envase plano único (reverso adhesivo) que asegura el mantenimiento del producto durante el transporte y "facilidad de uso" del producto final. Los geles premoldeados pueden ser transportados y almacenados durante hasta 28 días a 2 a 8°C, mientras que otros productos disponibles deben bien estar congelados o bien ser transportados a temperatura ambiente.

Ejemplo 1: Producto de elevada concentración de proteína ("Protoderm 500" y "Protoderm 1500").

Un primer modo de realización de la invención se diseña para optimizar tanto la elaboración rápida del producto para cicatrización de heridas como la rápida cicatrización comprendiendo componentes proteicos y células a concentraciones relativamente elevadas.

Matriz

En el primer modo de realización, la proteína de matriz es fibrina, obtenida a partir de un producto de fibrinógeno comercial, Tisseel [MR] (Baxter). Cuando se reconstituye, esto proporciona un sistema de dos componentes conveniente al que se le pueden añadir las células. Los componentes de la matriz se resumen en la tabla 1. Nótese que Tisseel [MR] también contiene Factor XIII, así como plasmafibrinectina y plasminógeno.

Tabla 1 – Componentes principales de Tisseel [MR]

Componente	Concentración final de los andamiajes celularizados
Proteína de matriz (fibrinógeno)	7,5 – 11,5 mg/mL
Aprotinina	300 KUI/mL
Trombina	25 UI/mL
Cloruro de calcio	4 mM

Como será evidente para los expertos en la técnica, las concentraciones de estos componentes se pueden variar si es necesario. Por ejemplo, el fibrinógeno se puede usar en concentraciones en el intervalo aproximado de 7–20 mg·mL⁻¹ para esta aplicación, la trombina en el intervalo de 5-50 UI/mL (de hecho, niveles de traza de trombina contaminante pueden producir eventualmente la formación de fibrina y la solidificación del gel sin trombina adicional, pero esto es inconveniente e impredecible), y el cloruro de calcio en el intervalo de 2-20mM. La aprotinina se usa para evitar la fibrinólisis no deseada pero, de nuevo, la concentración exacta puede variar.

Células

Los fibroblastos dérmicos humanos se obtuvieron por cultivo celular obtenidos de tejido de prepucio neonatal. En condiciones de BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio), las células fibroblásticas se aislaron por digestión con colagenasa y se extendieron por cultivo y pase seriado siguiendo las prácticas rutinarias de laboratorio para establecer un banco de células maestro (abreviado generalmente MCB por sus iniciales en inglés: master cell bank). El MCB se ensayó frente a un panel de virus, bacterias, micoplasma y hongos de origen animal y humano y se analizó la tumorigenicidad por un centro acreditado en BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) y se determinó que estaba libre de contaminación. A continuación se establecieron varios bancos de células de trabajo (abreviado como

WCB por sus iniciales en inglés: work cell bank) para elaborar el producto, se volvieron a analizar y las reservas de células se congelaron según los procedimientos estándar.

También se prevé que para algunas aplicaciones específicas para pacientes, se puedan cultivar y extender fibroblastos u otras células autólogas obtenidas mediante biopsias para ser utilizados.

- 5 Las células se pusieron en suspensión en las cantidades mostradas a continuación (P-500 se refiere a Protoderm-500; P-1500 se refiere a Protoderm-1500) en medio de cultivo celular Liebowitz L-15 tamponado y complementado como se muestra en la tabla 2 antes de la adición del componente de fibrinógeno. Como será evidente para los expertos en la técnica, el medio no previsto para usarlo en atmósfera enriquecida en CO₂ (usado habitualmente en las incubadoras de cultivos tisulares o en los viales sellados) debe ser tamponado de forma apropiada por algún otro sistema. Dichos medios complementados, por ejemplo con HEPES, son bien conocidos en la técnica. El medio Liebowitz L-15 depende de un sistema tampón de fosfato. El medio se complementó con bicarbonato de sodio y dextrosa, como se muestra.

Por conveniencia y consistencia, generalmente se preparó una “suspensión celular de trabajo” estándar de $1,5 \times 10^6$ células·mL⁻¹.

15 *Preparación del sellante de fibrina*

Como se describe en la figura 1 y se resume a continuación, se reconstituyó polvo de trombina Tisseel [MR] en una disolución de cloruro de calcio según las instrucciones del fabricante.

- 20 Una vez disuelta, la disolución de trombina/CaCl₂ se diluyó adicionalmente con medio L-15 complementado para obtener una “disolución de trabajo de trombina” y se refrigeró hasta su uso posterior durante un mínimo de 15 minutos (los geles también pueden elaborarse con la “disolución de trabajo de trombina” a temperatura ambiente). El fibrinógeno liofilizado se reconstituyó con una disolución de aprotinina antes de añadirlo a la suspensión celular de trabajo en medio L-15 complementado. Después de ser reconstituido, el fibrinógeno debe ser usado en 4 horas, idealmente en 1 a 2 horas.

La disolución de trabajo de trombina (6,75 mL) contiene:

- 25 trombina: 50 UI/mL (o 337,5 UI en total)
cloruro de calcio: 8 μmoles/mL (o 54 μmoles en total)
en L-15 complementado

(El total se refiere a la cantidad en 6,75 mL).

Mezcla de trabajo de suspensión celular y fibrinógeno (volumen total: 6,75 mL):

- 30 Tisseel: 19 mg/mL (o 128,25 mg en total)
aprotinina: 600 KUI/mL (o 4.050 KUI en total)
células: $1,2 \times 10^6$ células/mL ($8,1 \times 10^6$ células en total para el P-1500) o $0,4 \times 10^6$ células/mL ($2,7 \times 10^6$ células en total para el P-500)
en L-15 complementado.

- 35 (El total se refiere a la cantidad de 6,75 mL).

Tabla 2 – Detalles del medio usado para el ejemplo 1

Componentes (el suministrador se muestra entre paréntesis)	Función	Concentración por mL
Medio L-15 (Cambrex)	Administración de nutrientes al componente celular del producto. Mantiene la viabilidad celular y la estructura del gel.	N/A (medio base)
Bicarbonato de sodio (Mallinckrodt Chemical)	Necesario para la viabilidad celular	202,5 μg
Dextrosa (J. T. Baker)	Nutriente	4,5 mg
Adenina (ABCR)	Base necesaria para la viabilidad celular	24,4 μg

Componentes (el suministrador se muestra entre paréntesis)	Función	Concentración por mL
L-Glutamina (Molekula)	Aminoácido para la viabilidad celular	0,29 mg
Etanolamina (Molekula)	Fosfolípido para el metabolismo celular	6,2 µg
O-fosforil-etanolamina (Merck)	Fosfolípido para el metabolismo celular	14,12 µg
Hidrocortisona (Spectrum Laboratory Products Inc)	Esteroides necesarios para el metabolismo celular	0,4 mg
Insulina recombinante humana (Serologicals)	Hormona esencial	5 µg
Ácido selenioso (Molekula)	Sustancia traza para el metabolismo	6,78 ng
3,3',5-Triiodo-L-tironina (ABCR)	Hormona	1,35 ng
apo-Transferrina bovina (Serologicals)	Cofactor para el metabolismo del hierro	5 µg
Suero bovino fetal gamma-irradiado o suero de ternero recién nacido (JHR o Hyclone)	Nutrientes	2% v/v

Nota: Como será evidente para los expertos en la técnica, las fuentes de los ingredientes usados para producir la composición para cicatrización de heridas pueden diferir dependiendo del grado de pureza requerido para diferentes aplicaciones. Por ejemplo, para aplicaciones clínicas del producto puede ser necesario materiales de grado farmacéutico.

Solidificación de los geles

La disolución de trabajo de trombina (6,75 mL) y la mezcla de fibrinógeno Tisseel [MR]/suspensión celular (6,75 mL) se combinaron por medio de una unidad mezcladora Duplojet y se cargaron en un contenedor de moldeo pre-revestido (convenientemente, una placa Petri estéril o similar), mediante una aguja de 16G o equivalente. Es útil pre-revestir la placa de moldeo con suero que contiene medio o albúmina para evitar que el gel se adhiera. El gel solidificó en unos pocos minutos. El gel se bañó a continuación en 20 mL de medio (tabla 2) y la placa de moldeo se cubrió con una tapa. El gel solidificado se incubó a 37°C durante 16-24 horas para permitir el desarrollo (o maduración) de las células.

Envasado y almacenamiento

Después del desarrollo (o maduración), los geles solidificados se retiraron de sus contenedores de moldeo y se colocaron en bolsas de hojas estériles, se almacenaron en una bolsa estéril con un precinto *roto-seal*. Se añadieron 10 mL de medio sin suero (como en la tabla 2, sin el suero bovino fetal) a cada bolsa antes de sellarla. La durabilidad de las unidades selladas es hasta 28 días a 4°C.

Ejemplo 2: producto de baja concentración de proteína

Para algunas aplicaciones es posible usar concentraciones de proteína más bajas. La principal ventaja de esto es la reducción de los costes de producción, ya que las proteínas obtenidas del suero y muchos inhibidores de la proteasa, tal como la aprotinina, son caros. En un modo de realización preferido, la concentración de fibrina en el producto solidificado se reduce a menos de 7 mg·mL⁻¹. En la práctica se ha encontrado que 3,0-4,0 mg·mL⁻¹ es efectivo.

Una consideración importante es la eficacia (así como el coste) de usar aprotinina como inhibidor de la proteasa en dichos productos "de baja concentración de proteína". En particular, la dilución proporcional de los productos comerciales produce concentraciones de aprotinina que son demasiado bajas para ser eficaces. Una solución preferible es usar un inhibidor alternativo, tal como ácido tranexámico. Este no solo es un inhibidor altamente eficaz de la fibrinólisis, sino que tiene ventajas significativas en cuanto al coste.

Matriz

En este modo de realización la proteína de matriz es fibrina, obtenida a partir de un sellante de fibrina comercial, Tisseel [MR], usando ácido tranexámico en lugar de aprotinina. Los componentes clave de la matriz se resumen en la tabla 3. Nótese que la misma composición de matriz también podría obtenerse usando otro sellante de fibrina disponible comercialmente, Quixil. Sin embargo, la adición de ácido tranexámico exógeno debería reducirse ya que contiene ya este inhibidor.

Tabla 3.- Componentes de la matriz de fibrinógeno en el ejemplo 2

Componente	Concentración final en los andamiajes celularizados
Proteína de matriz (fibrinógeno)	3,5 mg/mL
Ácido tranexámico	10 mg/mL
Trombina	25 UI/mL
Cloruro de calcio	4mM

5 El fibrinógeno Tisseel [MR] liofilizado se reconstituye con disolución de medio L-15 complementado antes de añadirlo a la suspensión celular de trabajo en medio L-15 complementado. Después de reconstituido, el fibrinógeno Tisseel [MR] debe ser usado en 4 horas, idealmente en 1-2 horas.

El polvo de trombina Tisseel [MR] se reconstituye en una disolución de cloruro de calcio según las instrucciones del fabricante. Una vez disuelta, la disolución de trombina/CaCl₂ se diluye adicionalmente con medio L-15 complementado que contenía ácido tranexámico para obtener una disolución de trabajo de trombina.

10 La densidad celular usada está de nuevo en el intervalo de 450 a 2.500 células·mm⁻². Con el fin de minimizar los costes, puede ser adecuado usar una densidad celular de aproximadamente 450 a 550 células·mm⁻². Nótese, sin embargo, que la concentración de proteína y la densidad celular son variables independientes. La disminución de la concentración de proteína es el principal determinante del coste, más que la densidad celular. Sin embargo, ser capaz de usar menos células puede tener implicaciones para la velocidad de producción. En cualquier caso, se prevén modos de realización con elevada densidad celular/baja concentración de proteína y con baja densidad celular/elevada concentración de proteína y pueden ser preferidos en circunstancias específicas.

Ejemplo 3.- Envasado, almacenamiento y administración

20 Un factor principal que contribuye al éxito de composiciones para cicatrización de heridas tópicas es la facilidad de aplicarlas de forma precisa a la superficie de la herida de forma que se establezca un contacto cercano, sin burbujas de aire ni pliegues, en condiciones de operación estériles. Las composiciones para cicatrización de heridas pueden ser frágiles y la manipulación debe mantenerse al mínimo. La composición de la invención se envasa preferiblemente de forma que ayude y facilite la aplicación de forma significativa. Además, la composición se transporta y se almacena refrigerada en lugar de congelada, de forma que no son necesarios procedimientos de descongelación detallados antes del uso.

25 Después de la solidificación y de un periodo de 16-24 horas de cultivo y desarrollo (o maduración), los discos de gel individuales se envasan por inserción en una bolsa de plástico metalizado o de lámina flexible que comprende dos hojas rectangulares, selladas a lo largo de una parte esencial de tres de sus lados de forma que se forme una bolsa abierta. La superficie interna de una de estas hojas está modificada de forma que aumente su adherencia al producto de gel. En un modo de realización preferido, como se muestra en la figura 2, el envase usado es una bolsa de lámina pelable de Oliver [MR] Products Company (Grand Rapids, Michigan, Estados Unidos) que comprende una lámina metalizada y una hoja de poliéster laminado/lámina metalizada con revestimiento de adhesivo Q15 con un patrón de puntos. Q15/48BF1 es un material laminado de cubierta y de bolsa para dispositivos médicos. El objetivo de este revestimiento adhesivo con patrón de puntos es mejorar la eficacia del procedimiento de sellado térmico que se usa para sellar juntos los bordes de las hojas. Sin embargo, el adhesivo y el patrón de puntos elevado demuestran ser muy efectivos proporcionando una superficie en la que la composición se adhiere preferencialmente, en comparación con la superficie inerte suave, sin revestimiento de la hoja opuesta. Se podrían usar otras formas de revestimiento y/o rugosificación de la superficie de una de las superficies internas de la bolsa para obtener el mismo efecto. De forma similar, cualquier material laminado duradero, flexible, impermeable al agua y los gases adecuado puede ser usado para elaborar dicha bolsa. Todo el envase o una parte de él puede ser transparente para permitir la inspección visual, por ejemplo, de la integridad de la composición o del color de un tinte indicador de pH en el medio de cultivo celular, un volumen pequeño del cual se inserta en la bolsa junto con la composición antes de sellar la bolsa a lo largo del borde que permanece abierto.

Una vez sellada, la composición tiene una durabilidad de al menos 7-11 días, y preferiblemente hasta 28 días, más preferiblemente 21 días, a 2° a 8°C.

45 Para la aplicación, como se muestra en la figura 2, la bolsa se abrió, en condiciones estériles, dejando la composición adherida a la superficie interna tratada de una de las hojas que comprende la bolsa. Usando la hoja como base o como medio de soporte, la composición se aplica entonces a la superficie de la herida a la que, en ausencia de exudación excesiva, se adherirá preferentemente permitiendo que sea separada de la hoja. Este medio

de aplicación permite que la composición se aplique sin arrugamiento o incorporación de burbujas de aire, y con el mínimo de manipulación. Los bordes de la composición pueden recortarse fácilmente para ajustarse a los límites de la herida. Otra ventaja de la administración de la composición en un formato que es adherente al envase de forma reversible, como se ha escrito, es que permite una fácil identificación de la orientación del producto y facilita la aplicación orientada, en caso necesario. En el caso de un producto para cicatrización de heridas homogéneo, la orientación del producto sobre la herida no es importante. Sin embargo, cuando está involucrada una composición multicapas, tal como una con una capa de fibroblastos que está prevista que sea aplicada en contacto con la superficie de la herida y una capa de queratinocitos que está prevista que esté orientada lejos de la superficie de la herida, puede ser difícil o imposible establecer la orientación visualmente. En este caso, la capacidad de administrar el producto de una forma que haga imposible la aplicación incorrecta sin retirar antes la composición del envase ofrece una ventaja significativa.

Los ejemplos anteriores pretenden ilustrar la invención y no limitarla de ninguna manera.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un método para producir una composición para cicatrización de heridas que comprende células de fibroblastos vivos en una matriz de soporte de fibrina sólida o semisólida, en el que las células no están senescentes y tienen un fenotipo de cicatrización de heridas y en el que la composición es monocapa, comprendiendo el método las etapas de:
- (i) formar la matriz de soporte que contiene las células vivas en la que las células están en suspensión en la matriz; donde la matriz de fibrina tiene una concentración de fibrina en el intervalo de 3 a 12 mg·mL⁻¹; y donde la matriz de soporte está formada con una densidad celular de 450 a 2.500 células por mm²;
 - 10 (ii) incubar las células en la matriz de soporte durante 16 a 24 horas a 37°C para permitir el desarrollo del fenotipo de cicatrización de heridas;
 - (iii) envasar la composición en un contenedor adecuado para almacenar la composición; y
 - (iv) almacenar la composición después de incubación y antes de su uso durante 40 días, a una temperatura de 2°C a 8°C, manteniendo a la vez el fenotipo de cicatrización de heridas.
- 15 2.- El método según la reivindicación 1, en el que la composición se almacena después de la incubación y antes de su uso durante hasta 19 días.
- 3.- El método según la reivindicación 1, en el que la composición se almacena después de la incubación y antes de su uso durante 7 a 14 días.
- 20 4.- El método según la reivindicación 1, en el que la composición se almacena después de la incubación y antes de su uso durante 7 a 11 días.
- 5.- El método según la reivindicación 1, en el que la composición se almacena después de la incubación y antes de su uso a una temperatura de 3°C a 5°C.
- 6.- El método según la reivindicación 1, en el que la composición se almacena después de la incubación y antes de su uso a una temperatura de 4°C.
- 25 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células son de mamífero.
- 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células son humanas.
- 9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición contiene células que son sólo fibroblastos.
- 30 10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición contiene células que son 90% a 100% fibroblastos.
- 11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 ó 10, en el que la composición contiene células que son 95% a 99,5% fibroblastos.
- 12.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 u 11, en el que la composición contiene células que son 97,5% a 99% fibroblastos.
- 35 13.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que los fibroblastos son fibroblastos dérmicos.
- 14.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que los fibroblastos son fibroblastos dérmicos humanos.
- 15.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición contiene células que excluyen los queratinocitos.
- 40 16.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células son sintéticamente activas.
- 17.- El método según la reivindicación 16, en el que las células sintetizan proteínas de la matriz extracelular, tales como colágeno de tipos I y III, fibronectina y vitronectina.
- 18.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células son no proliferativas.
- 45 19.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células están en suspensión uniformemente en la matriz.

- 20.- El método según la reivindicación 1, en el que la fibrina tiene una concentración en el intervalo de 7 a 12 mg·mL⁻¹.
- 21.- El método según la reivindicación 1, en el que la fibrina tiene una concentración en el intervalo de 3 a 5 mg·mL⁻¹.
- 5 22.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la matriz de fibrina está formada por la polimerización del fibrinógeno mediada por la trombina.
- 23.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la matriz es no pirogénica y/o estéril.
- 24.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una etapa de añadir un inhibidor de la proteasa.
- 25.- El método según la reivindicación 24, en el que el inhibidor de la proteasa es aprotinina y/o ácido tranexámico.
- 10 26.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición formada en la etapa (i) tiene un grosor de 8 mm o menos.
- 27.- El método según la reivindicación 26, en el que la composición formada en la etapa (i) tiene un grosor de 5 mm o menos.
- 15 28.- El método según la reivindicación 1, en el que la matriz de soporte está formada con una densidad celular de 750 a 2.000 células por mm².
- 29.- El método según la reivindicación 1, en el que la matriz de soporte está formada con una densidad celular de 900 a 1.700 células por mm².
- 30.- El método según la reivindicación 1, en el que la matriz de soporte está formada con una densidad celular de 1.500 células por mm².
- 20 31.- El método según la reivindicación 1, en el que la matriz de soporte está formada con una densidad celular de 450 a 550 células por mm².
- 32.- El método según la reivindicación 1, en el que la matriz de soporte está formada con una densidad celular de 500 células por mm².
- 25 33.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición se envasa en un contenedor adecuado para transportar la composición y/o para aplicar la composición por vía tópica a una superficie de piel.
- 34.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición se envasa en un contenedor que comprende una bolsa flexible que consiste en dos hojas de material flexible impermeable sellado periféricamente para proporcionar un medio de contención para la composición, comprendiendo la bolsa una primera superficie interna a la que la composición se adhiere con un nivel de adhesión mayor que el nivel entre la composición y una segunda superficie interna de la bolsa, pero menor que el nivel entre la composición y la superficie de la piel, de forma que al usarse la bolsa puede abrirse separando las hojas y la composición puede manipularse convenientemente y aplicarse directamente a la superficie de la piel sin ningún requisito adicional para que la composición sea tocada directamente por ningún otro medio antes de su aplicación.
- 30 35.- El método según la reivindicación 34, en el que el contenedor es un "material para bolsa pelable resistente a los disolventes" de Oliver [MR] Products Company (Número de producto: Q15/48BF1).
- 36.- El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa de formar la matriz de soporte se produce en un molde.
- 40 37.- Una composición para cicatrización de heridas que comprende células de fibroblastos dérmicos humanos vivos en suspensión en una matriz de soporte de fibrina, sólida o semisólida, no pirogénica, monocapa, estéril, formada por polimerización del fibrinógeno mediada por la trombina, en la que la matriz de fibrina tiene una concentración de fibrina en el intervalo de 3 a 12 mg·mL⁻¹, donde la matriz de soporte está formada con una densidad celular de 450 a 2.500 células por mm², y donde la composición ha sido incubada durante 16 a 24 horas a 37°C de forma que las células no son senescentes y tienen un fenotipo de cicatrización de heridas, en el que la composición se envasa después de la incubación en un contenedor adecuado para almacenar la composición.
- 45 38.- La composición para cicatrización de heridas según la reivindicación 37, en la que la composición se envasa en un contenedor adecuado para transportar la composición y/o aplicar la composición por vía tópica a una superficie de piel.
- 50 39.- La composición para cicatrización de heridas según la reivindicación 38, en la que el contenedor comprende una bolsa flexible que consiste en dos hojas de material flexible impermeable sellado periféricamente para

- proporcionar un medio de contención para la composición, comprendiendo la bolsa una primera superficie interna a la que la composición se adhiere con un nivel de adhesión mayor que el nivel entre la composición y una segunda superficie interna de la bolsa, pero menor que el nivel entre la composición y la superficie de la piel, de forma que al usarse la bolsa puede abrirse separando las hojas y la composición puede manipularse convenientemente y aplicarse directamente a la superficie de la piel sin ningún requisito adicional para que la composición sea tocada directamente por ningún otro medio antes de su aplicación.
- 5
- 40.- La composición para cicatrización de heridas según cualquiera de la reivindicación 38 o la reivindicación 39, en la que el contenedor es un "material para bolsa pelable resistente a los disolventes" de Oliver [MR] Products Company (Número de producto: Q15/48BF1).
- 10
- 41.- La composición para cicatrización de heridas según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40, para usarla como un medicamento.
- 42.- La composición para cicatrización de heridas según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40, para usarla como un medicamento en el tratamiento de una lesión cutánea.
- 15
- 43.- La composición para cicatrización de heridas según cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40 para usarla según la reivindicación 42, para aplicación tópica a una lesión cutánea como una úlcera venosa, una úlcera diabética, una escara por presión, una quemadura o una herida por irritación iatrogénica.

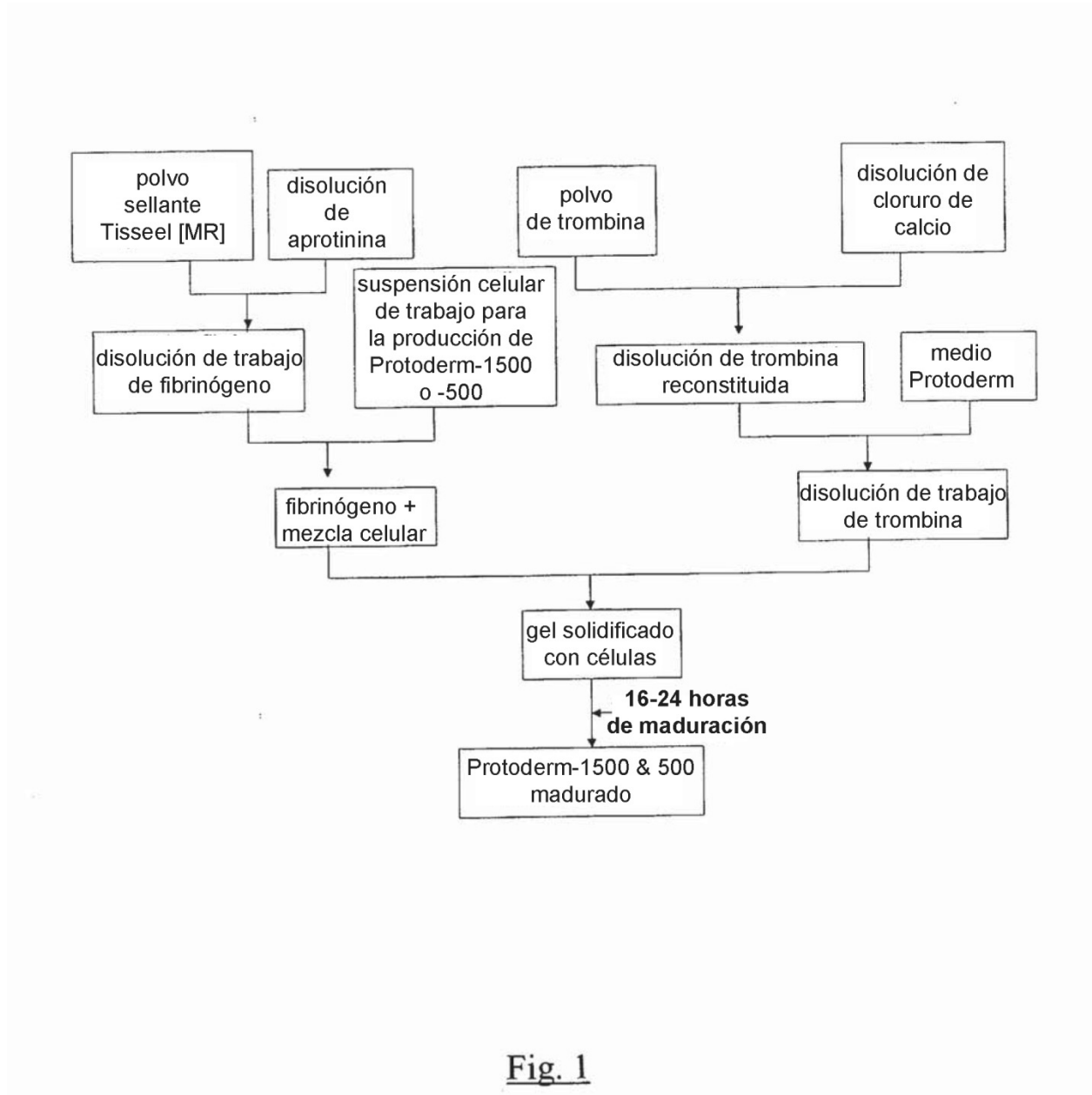


Fig. 1

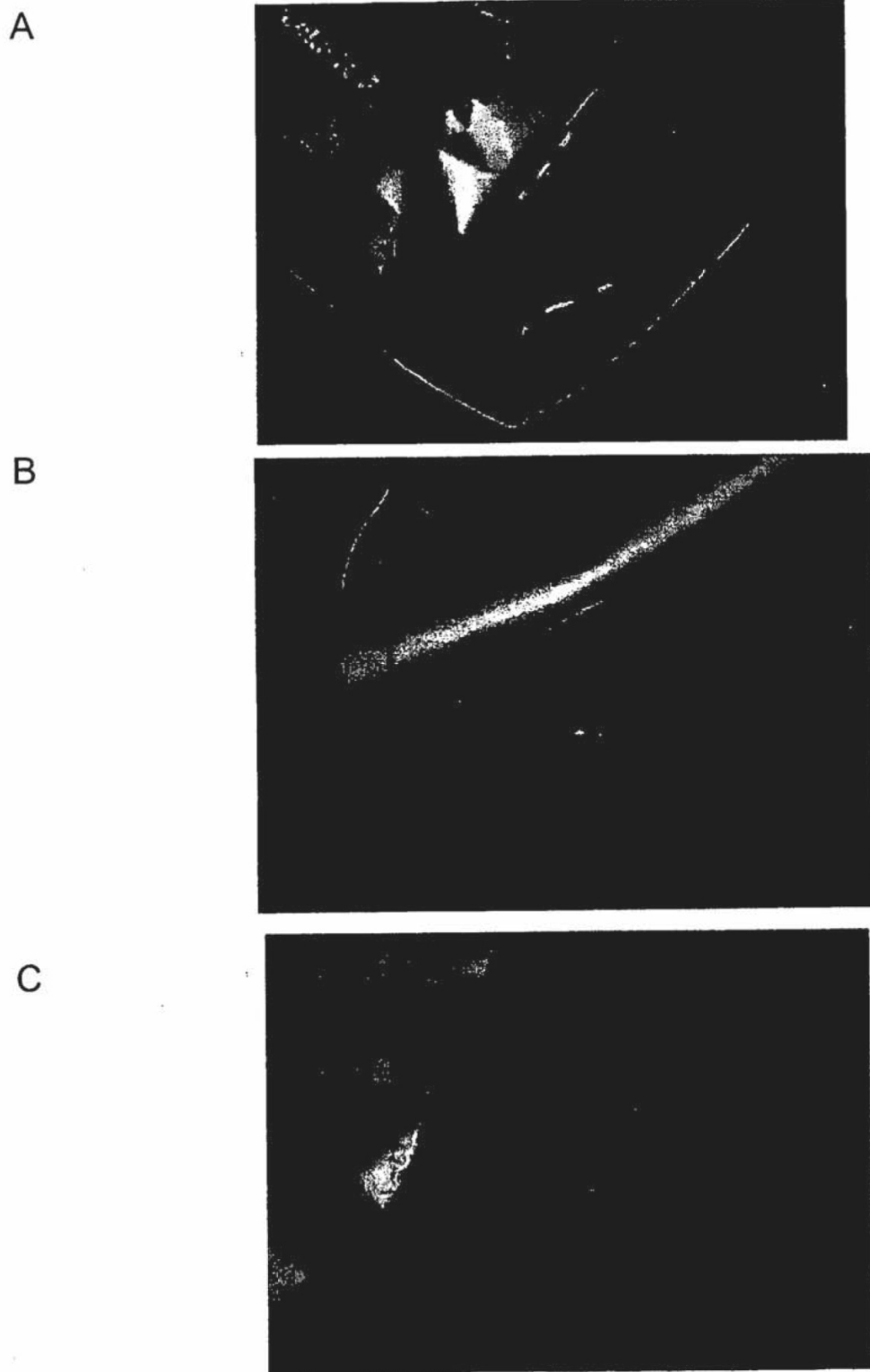


Fig. 2