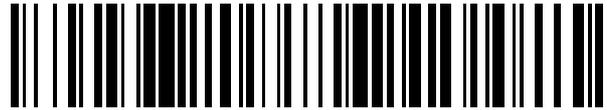


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 353**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2002 E 10184235 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2343079**

54 Título: **Dispositivo para la preparación de suspensiones celulares**

30 Prioridad:

**07.02.2001 AU PR298901
04.04.2001 US 281527 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2015

73 Titular/es:

**AVITA MEDICAL LTD (100.0%)
Unit B1, Beech House, Melbourn Science Park,
Cambridge Road
Melbourn, Royston, Hertfordshire SG8 6HB , GB**

72 Inventor/es:

**STONER, MARIE y
WOOD, FIONA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 534 353 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

Dispositivo para la preparación de suspensiones celulares

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una técnica simple, rápida y económica de injertar células, y en particular a un dispositivo para preparar una suspensión de células de una muestra tisular obtenida de una zona donante y aplicar dicha suspensión de células a una zona receptora.

FUNDAMENTO DE LA INVENCION

10 Existen muchos métodos de tratar las heridas que son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, existen técnicas de injertos de piel que pretenden reconstruir las zonas del cuerpo que recubren la piel donde existen daños o defectos. En general, estos tipos de injertos se han clasificado conforme a su relación huésped-donante y en función de su grosor. El injerto más aplicado clínicamente es el injerto autólogo, donde el tejido se extrae de una zona del cuerpo y se aplica en otra zona. El tejido injertado desarrolla entonces un nuevo aporte sanguíneo y se agarra a los tejidos subyacentes.

15 Existen varios tipos de injertos cutáneos entre los que mencionaremos los injertos cutáneos de espesor parcial, los injertos de espesor total y los microinjertos. Cada uno de estos injertos se debe preparar usando ciertas técnicas y cada una de ellas tiene sus ventajas e inconvenientes. Los injertos de espesor parcial a menudo requieren una habilidad considerable, tiempo y un equipo caro. Además las zonas donantes son dolorosas, dan lugar a una deformidad cicatricial y limitan la zona capaz de ser recubierta. Aunque pueden ser más satisfactorios que los injertos de espesor total, suelen ser menos atractivos desde el punto de vista cosmético. Los injertos de espesor total requieren menos habilidad o equipo caro y su aspecto cosmético es mejor que el de los injertos de espesor parcial. Sin embargo, los injertos de espesor total no se “agarran” tan bien como los injertos de espesor parcial. Los microinjertos se llevan a cabo más fácilmente y no requieren instrumentos especiales. Sin embargo, su aspecto cosmético no es tan bueno como otras técnicas, ya que la deformidad cicatricial resultante es inaceptable.

20 Una variación de las técnicas de injerto mencionadas es el injerto de malla, que es un tipo de injerto parcial o injerto cutáneo total en el cual se cortan tiras paralelas de rajas del tejido a tratar. Algunas de las ventajas de los injertos de malla incluyen: una cobertura mayor del área afectada, drenaje de sangre o suero de debajo del injerto y elevada conformidad del injerto a las zonas receptoras desiguales. Esta técnica ha tenido mucho éxito con un 90 hasta un 100% de agarre cuando los injertos se han aplicado sobre lechos de granulación sanos.

30 Una alternativa al injerto cutáneo parcial consiste en que se forme una ampolla bajo la succión en una zona donante y se trasplante a la zona receptora. La producción de ampollas para tratar las heridas se ha venido utilizando desde los años sesenta. Las ampollas son creadas por un dispositivo de succión como el Dervamac™ a una presión de succión de aproximadamente 250-300 mmHg durante 1-2 horas. Las ampollas se cortan luego y se colocan sobre la herida. El tiempo de cicatrización es de unos 10-14 días. Hay algunos inconvenientes en este método como la cantidad de tiempo requerida para preparar el injerto que es demasiado larga y eso hace que no se produzca una repigmentación de la zona; o bien una pigmentación desigual alrededor de los bordes de la zona de tratamiento.

40 El micro-injerto ha llegado a ser un método más frecuente para cubrir una zona grande e implica el recorte de una serie de secciones muy pequeñas de tejido de una zona donante y su aplicación luego a una gasa, que se colocará luego sobre la herida.

45 La tecnología más avanzada para la generación de un tejido in vitro consiste en cultivar la epidermis. Los autoinjertos epiteliales cultivados (CEA) son un apéndice importante en la cobertura de quemaduras y otras situaciones en las que zonas grandes de la superficie corporal experimentan pérdida de piel. Hay muchos centros en el mundo con instalaciones para el cultivo celular cuyo objetivo es producir injertos epiteliales autólogos que se utilizarán en una variedad amplia de aplicaciones. La utilidad y aplicación del CEA está relacionada con su habilidad para conseguir láminas de células confluentes capaces de ser injertadas. Esta técnica vence muchos de los inconvenientes de tratamientos anteriores ya descritos. Por ejemplo, los autoinjertos epiteliales autólogos reducen la demanda de zonas donantes. Sin embargo, estos autoinjertos son lentos en su crecimiento y requieren tiempo para cultivar los injertos, lo que a menudo excede al tiempo de preparación de las zonas receptoras.

50 Se estudia una suspensión celular junto con un método para preparar dicha suspensión y la presente invención proporciona un dispositivo para preparar esa suspensión con el objetivo de disminuir uno o más de los inconvenientes asociados a la tecnología sobre los injertos del modelo anterior.

RESUMEN DE LA INVENCION

60 Se revela la posibilidad de una suspensión celular única y de un método para su preparación que deberá ser rápido, eficiente y simple de preparar y aplicar. También se revela la posibilidad de un método para tratar un paciente

usando la suspensión celular única y esta invención hace referencia a un aparato capaz de ser utilizado en la preparación del método. Aunque el uso del dispositivo descrito no es esencial para practicar el método revelado se ha observado que reduce de forma significativa la complejidad asociada al uso de la tecnología de injertos convencional como la CEA.

5 Se revela un método para preparar una suspensión celular adecuada para su aplicación a un paciente, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 10 a) Someter una muestra tisular que incluya células adecuadas para trasplantar a un paciente, a al menos un medio de disociación físico y/o químico capaz de disociar el estrato celular en la muestra tisular;
- b) Retirar la muestra tisular de la presencia del medio disociante del tejido utilizado en la etapa (a) y cultivar en presencia de una solución de nutriente células de la muestra tisular, células adecuadas para trasplantar a un paciente, donde la solución nutriente (i) está libre de suero xenogénico, (ii) es capaz de mantener la viabilidad de las células hasta que se aplique a un paciente y (iii) es adecuada para la aplicación directa a una región en un paciente que está siendo sometido a un trasplante; y
- 15 c) Filtrar la suspensión celular creada de acuerdo con la etapa b) para eliminar grandes conglomerados celulares.

20 Preferiblemente el medio disociante es de naturaleza química como una enzima que es capaz de romper el enlace celular, por ejemplo, la tripsina. Además, preferiblemente, la suspensión celular filtrada se diluye a una densidad celular apropiada usando una solución de nutriente, que puede tratarse de una solución salina básica hasta incluso una solución de nutriente más compleja.

25 También se revela la posibilidad de una suspensión celular preparada conforme al método anterior. Preferiblemente las células de la suspensión son células autólogas (es decir, son aisladas del paciente por medio de un autoinjerto). Los inventores han observado que al retirar el suero xenogénico de la suspensión celular existe menos probabilidad de transmisión de una infección y se eliminan las reacciones xenogénicas entre un paciente y el suero. Otro rasgo de la suspensión celular producida conforme al método anterior es que la muestra tisular utilizada para aislar las células en la suspensión se retira de la solución enzimática antes de que se inicie el cultivo de las células. Cuando las células se exponen a enzimas capaces de dañar la adhesión intercelular, la viabilidad de la suspensión celular disminuye con el tiempo, reduciendo por tanto la eficacia del injerto cuando se aplica a un paciente. Se ha observado que la suspensión celular creada conforme al método anterior posee una viabilidad celular mayor si se compara con métodos comparativos que cultivan las células a intervalos regulares mientras el tejido está inmerso en presencia de enzimas como la tripsina.

35 También se ha divulgado un método para tratar un paciente que necesita cirugía para el injerto, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 40 a) Preparación de una suspensión celular conforme al método anterior;
- b) Administración de la suspensión directamente a una zona en el paciente que requiere un injerto celular de manera que se facilite la difusión de la suspensión celular en una distribución relativamente uniforme por la zona del injerto.

De un modo alternativo se revelaba el uso de una suspensión celular adecuada para injertos, de manera que la suspensión se prepara según las etapas siguientes:

- 45 a) Someter a una muestra tisular que incluya células adecuadas para el injerto a un paciente, a una enzima capaz de disociar piezas cohesionadas del estrato tisular en la muestra;
- b) Retirar la muestra de la solución enzimática utilizada en la fase a) y cultivar en presencia de la solución de nutriente células de la muestra tisular, células adecuadas para el injerto a un paciente, donde la solución nutriente (i) está libre de suero xenogénico, (ii) es capaz de mantener la viabilidad de las células hasta que se aplique a un paciente y (iii) es adecuada para la aplicación directa a una región en un paciente que está siendo sometido a un trasplante; y
- 50 c) Filtrar la suspensión celular creada de acuerdo con la etapa b) para eliminar grandes conglomerados celulares;

55 para la preparación de medicamentos adecuados para el tratamiento de los trastornos tisulares que requieren un injerto.

De acuerdo con la invención existe un aparato para desarrollar en el perioperatorio una suspensión celular de una muestra tisular de la piel, y para aplicar inmediatamente la suspensión celular a una zona del injerto del paciente. Dicho aparato consta de una primera pieza o elemento (18), una segunda pieza (30), un grupo de herramientas requeridas para el cultivo celular y una boquilla de pulverización para aplicar la suspensión celular a la zona del injerto, en la que:

- 65 (i) La primera pieza(18) incluye:

- 5 a) Un medio de calentamiento adecuado para calentar una solución enzimática a una temperatura requerida y que es capaz de mantener esa solución a la temperatura deseada durante un cierto tiempo, donde la solución enzimática precalentada se utiliza para incubar una muestra de tejido cutáneo y contiene una cantidad de enzima suficiente para disociar el estrato celular en la muestra tisular cutánea;
- 10 b) Una cavidad para el filtro(28) que comprende un medio de filtración(29) de un tamaño entre 50µm y 200µm, para eliminar los congregados celulares de las células cultivadas de la muestra tisular cutánea, para formar la suspensión celular que sea capaz de una dispersión inmediata a la zona del injerto;
- 15 c) Al menos un depósito de contención o retención de líquido(26) para el almacenamiento de una solución de nutriente adecuada para una aplicación directa a la zona del injerto, donde la solución de nutriente se utiliza para suspender las células tras la liberación de las células de la muestra de tejido cutáneo; y
- d) Un compartimento de almacenamiento(36) para almacenar el grupo de herramientas requeridas para el cultivo celular; y
- (ii) La segunda pieza(30) consta de un recipiente(34) para mantener la muestra tisular cutánea y la solución de nutriente en la retención del líquido, de manera que el recipiente sea de un tamaño suficiente para permitir la manipulación de la muestra tisular cutánea, la separación del estrato celular y el cultivo de las células del estrato adecuadas para el injerto;

20 de tal forma que la primera pieza(18) dispone de un asiento(38) sobre el cual se puede colocar la segunda pieza(30) durante la manipulación de la muestra tisular cutánea.

Cuando la solución enzimática se pone en contacto con el medio de calentamiento se calienta de tal modo que se evita el calentamiento localizado en la solución.

25 Otros aspectos y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto para los expertos a partir de una revisión de la descripción adjunta, que se lleva a cabo teniendo en cuenta las figuras siguientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 30 La figura 1 ilustra una visión en perspectiva del aparato con la tapa abierta y la segunda pieza en su sitio
La figura 2 corresponde a una visión en perspectiva del aparato con la tapa abierta y la segunda pieza aparte e invertida
La figura 3a ilustra una visión en perspectiva de la primera pieza del aparato
La figura 3b ilustra una visión en perspectiva del dorso de la primera pieza del aparato
35 La figura 4 ilustra una visión en perspectiva de la base del aparato

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

General

40 Los expertos en la materia apreciarán que la descripción aquí realizada es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Se entiende que la invención incluye todas esas variaciones y modificaciones. La invención incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos que hagan referencia o se indiquen en la especificación, individual o colectivamente y a cualquiera y a todas las combinaciones o bien a dos o más de las etapas o características.

45

La presente invención no puede estar limitada en su alcance por las configuraciones específicas aquí descritas, que únicamente se han dispuesto a modo de ejemplo.

50 En las especificaciones y reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender" o variaciones de la misma como "comprende" o "comprendiendo" se entenderán que implican la inclusión de un determinado entero o grupo de enteros pero no la exclusión de algún entero o grupo de enteros.

DESCRIPCIÓN DE LAS CONFIGURACIONES PREFERIDAS

55 Teniendo en cuenta lo establecido, se revela la posibilidad de un único método y la invención dispone de un único dispositivo adecuado para fabricar una suspensión celular trasplantable de tejido vivo adecuada para trasplantar a un paciente. Al aplicar el método y/o al utilizar el dispositivo se cultiva el tejido donante, sometido a un medio de disociación del tejido, se recogen las células adecuadas para efectuar el injerto en un paciente y se dispersan en una solución que es adecuada para su inmediata dispersión por la zona del injerto receptor.

60

La invención a debatir tiene muchas ventajas respecto al modelo anterior, y algunas de éstas se ilustran en los párrafos siguientes:

- 65 1. Dispone de un método eficiente en cuanto al tiempo para proporcionar una cubierta celular a un tejido en un entorno clínico. Es decir, las células están disponibles cuando se necesitan en el momento de la cirugía.

Esto se consigue porque el periodo de preparación de las células es muy corto, lo que permite que el injerto se realice perioperatoriamente o en la consulta de un médico especialista o de un médico de familia.

2. Dispone de un aparato y se ha revelado un método el cual reduce de forma significativa la complejidad asociada al uso del CEA convencional y es particularmente útil en los casos de quemaduras que se han presentado últimamente. En algunos casos, no se puede disponer de las células en el momento de la cirugía, o bien debido a un retraso en el paciente referido con una quemadura no cicatrizada o simplemente porque el tiempo necesario para el cultivo de los injertos ha excedido el de preparación del lecho de la herida receptora. La presente invención mejora el aspecto del tiempo de preparación del injerto.
3. Ayuda en la obtención de una rápida cobertura celular en las zonas de lesión y zonas donantes. Dispone de un medio para reducir el tamaño de las zonas donantes – la biopsia de la zona donante es notablemente inferior a la zona donante del injerto cutáneo parcial y reduce o elimina el uso de zonas donantes de injerto cutáneo parcial; mejora la velocidad de expansión de la cobertura celular; mejora la velocidad de cicatrización de las pequeñas quemaduras; es útil para pequeñas zonas de reconstrucciones cutáneas, como cicatrices; y mejora la calidad de la cicatriz.
4. Mejora los problemas asociados al uso de soluciones durante el proceso del cultivo celular tisular convencional. De acuerdo con el método de preparación y tratamiento las células utilizadas en un injerto se suspenden en una solución de nutriente libre de suero xenogénico. Dicha suspensión se coloca luego directamente en la zona receptora.
5. Dispone de un medio para el tratamiento de diversos trastornos o enfermedades cutáneas. Por ejemplo, se puede utilizar para lo siguiente: reaparición de la epidermis, sustitución después de la pérdida de piel, durante la repigmentación de una zona de la piel hacer que coincida con la zona, tratamiento de heridas por quemaduras, leucodermia, vitíligo, piebaldismo, en el tratamiento de cicatrices – por ejemplo, causadas por una curación incorrecta de la herida, dirección inapropiada de la cicatriz o alteración de la cicatriz por contracción de la herida, cicatrices por acné; revestimiento de la dermatitis cosmética, revestimiento después de un tratamiento de láser y después de una reconstrucción dérmica. Además el método se puede utilizar para una terapia de restitución celular, que incluye por ejemplo, el tratamiento de restitución de células nerviosas, el tratamiento de restitución de células epiteliales (como la célula urotelial, la célula de la mucosa bucal y la célula epitelial respiratoria) , el tratamiento de restitución de células endoteliales y el tratamiento de restitución de células precursoras osteogénicas.
6. Dispone de un medio para preparar una suspensión de células en una proporción comparable a las vistas in situ. Es decir, debido a la forma de preparación de la suspensión celular, células como los queratinocitos, las células basales, las células de Langerhans, los fibroblastos y los melanocitos han incrementado sus índices de supervivencia en comparación con las técnicas de cultivo tisular estándar, de manera que un cultivo celular selectivo puede dar lugar a la pérdida de ciertos tipos de células. Esto tiene la ventaja de que permite la correcta repigmentación de la piel después de un injerto tisular.
7. Permite una cirugía y curación más rápida, reduciendo con ello el trauma para los pacientes durante la fase de su cuidado médico.

Se ha revelado un método para preparar una suspensión celular adecuada para ser utilizada en el revestimiento y la regeneración del tejido dañado.

De acuerdo con este método, el tejido (preferiblemente de naturaleza autóloga) se recoge de un paciente por medio de una técnica de injerto tisular conocida. Preferiblemente se realiza una biopsia tisular. Al recoger la biopsia se debe tener en consideración la profundidad de la biopsia y el tamaño del área superficial. La profundidad y el tamaño de la biopsia influyen en la facilidad como se puede realizar el procedimiento y la velocidad a la cual se recupera un paciente del procedimiento. Preferiblemente la zona del donador se debería elegir que coincidiera de forma apropiada con la zona del receptor, por ejemplo, postauricular para cabeza y cuello, muslo para piezas inferiores, brazo superior interior para piezas superiores, o palma o planta o viceversa.

Una vez recogida la biopsia de un paciente la muestra tisular se somete a un medio de disociación físico y/o químico capaz de disociar el estrato celular en la muestra tisular.

Los métodos para disociar las capas celulares en los tejidos son bien conocidos. Por ejemplo, el medio de disociación puede ser un medio de rotura físico o químico. Un medio de disociación físico podría incluir, por ejemplo, el raspado de la muestra tisular con un escalpelo, picando el tejido, cortando físicamente varias capas o perfundiendo el tejido. La disociación química podría incluir, por ejemplo, la digestión con enzimas como la tripsina, dispasa, colagenasa, tripsina-EDTA, termolisina, pronasa, hialuronidasa, elastasa, papaína y pancreatina. También se pueden utilizar soluciones no enzimáticas para la disociación del tejido.

Preferiblemente, la disociación de la muestra tisular se consigue colocando la muestra en una solución enzimática precalentada que contiene una cantidad de enzima suficiente para disociar el estrato celular en la muestra tisular. Esto se puede conseguir, por ejemplo, usando una solución de tripsina, aunque también se puede utilizar cualquier otra enzima como la dispasa, colagenasa, tripsina-EDTA, termolisina, pronasa, hialuronidasa, pancreatina, elastasa y papaína que haga que las células se despeguen de otras células o de las superficies sólidas con esta finalidad. Si la enzima utilizada es la tripsina la solución enzimática utilizada en el método está preferiblemente libre de calcio y magnesio. Dicha solución es preferiblemente una solución salina tamponada de fosfato sin iones calcio o magnesio.

5 En el caso de que la biopsia tisular proceda de la piel de un paciente (que consta de células epiteliales) la cantidad de tripsina que se podría utilizar en el método se encuentra preferiblemente entre un 5 y un 0,1% de tripsina por volumen de solución. La concentración de tripsina deseable de la solución está entre un 2,5 y un 0,25%, siendo la de 0,5% de tripsina la preferida.

10 El periodo de tiempo durante el cual la muestra tisular se somete a la solución de tripsina puede variar dependiendo del tamaño de la muestra de biopsia tomada. Preferiblemente la muestra tisular se coloca en presencia de la solución de tripsina durante tiempo suficiente para debilitar la unión cohesiva entre los estratos tisulares. Por ejemplo, donde la muestra tisular se toma de la piel de un paciente la muestra se podría colocar en tripsina durante un periodo de tiempo de 5 a 60 minutos. Preferiblemente la muestra tisular se sumerge en la solución de tripsina entre 10 y 30 minutos siendo óptimos unos 15 a 20 minutos para la mayoría de muestras tisulares.

15 Una vez la muestra tisular se ha sumergido en la solución de tripsina durante un tiempo apropiado, la muestra se retira de la tripsina y se lava con solución de nutriente. El lavado de la muestra tisular puede implicar una inmersión parcial o completa de la muestra tratada en la solución de nutriente. Alternativamente, y más preferiblemente, se aplica la solución de lavado en volumen suficiente para retirar y o diluir de forma significativa cualquier exceso de solución de tripsina de la superficie de la muestra. Preferiblemente cualquier dilución daría lugar a menos de un 0,05% de tripsina en la solución de nutriente.

20 La solución de nutriente utilizada en el método debería ser capaz de reducir de forma significativa y más preferiblemente eliminar el efecto de la tripsina o bien por dilución o por neutralización. La solución de nutriente utilizada en el método tendrá las características de encontrarse (i) libre al menos de suero xenogénico, (ii) de ser capaz de mantener la viabilidad de las células hasta que se aplica a un paciente, y (iii) de ser adecuada para la aplicación directa a una zona en un paciente sometido a un injerto tisular. La solución puede ser una solución salina básica hasta una solución de nutriente más compleja. Preferiblemente estará libre de todo tipo de suero pero contendrá sales similares a los fluidos del cuerpo humano; este tipo de solución se denomina a menudo solución salina fisiológica. Los fosfatos o bien otro tipo de sustancias no tóxicas pueden ser tampones para la solución con el fin de mantener el pH a un nivel aproximadamente fisiológico. Una solución de nutriente adecuada y especialmente preferida es la solución de Hartmann.

30 Tras aplicar la solución de nutriente a la muestra tisular, los estratos celulares de la muestra se separan permitiendo que las células capaces de reproducirse sean eliminadas del material celular, y suspendidas en la solución de nutriente. En el caso de una muestra tisular de piel la dermis y la epidermis se separan preferiblemente para permitir el acceso a la unión dérmica-epitelial de ambas superficies.

35 Las células capaces de reproducirse son luego eliminadas del estrato separado siguiendo cualquier método conocido. Preferiblemente, las células reproductoras son rascadas de la superficie del sustrato usando un instrumento como una escápula. Las células capaces de reproducirse en la unión dermoepitelial incluyen pero no se limitan a queratinocitos, células basales, células de Langerhans, fibroblastos y melanocitos. Tras la liberación de las células de la muestra tisular éstas se colocan en una solución de nutriente. Preferiblemente solo un pequeño volumen de solución de nutriente se aplica a la muestra tisular durante la etapa de cultivo ya que de lo contrario la suspensión se volvería demasiado fluida y surgirían dificultades en la aplicación de la suspensión al injerto.

40 Para evitar conglomerados celulares excesivamente grandes en la suspensión celular ésta se filtra. Se puede utilizar cualquier filtro capaz de separar conglomerados celulares excesivamente grandes de la suspensión en esta etapa preferida de la invención. Se prefiere con diferencia el tamaño de filtro entre 50µm y 200µm. Mas preferiblemente entre 75µm y 150µm, siendo 100µm el de una muestra específica.

45 Antes de la aplicación a la zona del injerto o inmediatamente después del filtrado, la suspensión celular se puede diluir para dar lugar a una densidad celular apropiada, adecuada para el objetivo de la suspensión.

50 También se revela la posibilidad de una suspensión celular acuosa fabricada por el método descrito. La suspensión celular es muy adecuada para la regeneración del tejido y las técnicas de los injertos. Un avance importante en el uso de dicha suspensión en la tecnología de los injertos es que se puede utilizar para expandir la zona o el volumen de una herida que se puede tratar rápidamente por la multiplicación in situ de un número limitado de células. El número y la concentración de células sembradas en la zona del injerto se podrá modificar variando la concentración de las células en suspensión, o bien modificando la cantidad de suspensión que va a ser distribuida en una zona o volumen determinado de la zona del injerto.

55 Al suspender las células en una solución de nutriente que está al menos (i) libre de suero xenogénico, (ii) es capaz de mantener la viabilidad de las células hasta que se aplica a un paciente, y (iii) es adecuada para la aplicación directa a una zona en un paciente sometido a injerto tisular, los inventores han descubierto que el resultado de los injertos del paciente ha mejorado. Una explicación parcial de esto parece atribuirse a la retirada del suero xenogénico y más preferiblemente a todo el suero de la suspensión celular. El suero xenogénico en un aditivo común en el medio de cultivo para el injerto y se sabe que causa problemas potenciales de ineficacia e

hipersensibilidad. Sin embargo, dicho suero se requiere generalmente para la expansión in vitro de las células y para neutralizar la acción de la enzima si la enzima utilizada es la tripsina. La solución nutritiva utilizada no requiere dicho suero porque la población celular en la suspensión no se expande antes de su aplicación a la zona del injerto. Se estimula más bien la multiplicación celular en el paciente antes que en el sistema in vitro. Cuando se utiliza tripsina se consigue una neutralización por otro medio.

Otra característica única de la suspensión celular fabricada conforme al método revelado es que la composición de las células en la preparación celular es comparable a la observada in situ si se compara con la preparación celular del modelo anterior. Una posible explicación de esto es que en el modelo anterior, el cultivo de la preparación celular utiliza un cultivo selectivo para los queratinocitos, por lo que se produce una pérdida de constituyentes celulares como los fibroblastos y melanocitos mientras que la suspensión celular fabricada a partir del método revelado tiene una composición celular comparable a la de la población celular in situ. Otra característica de la suspensión celular fabricada a partir del método revelado es que las células del injerto son más viables puesto que se han cultivado en una solución de nutriente de un modo diferente a los procedimientos de cultivo celular del modelo anterior que utilizan técnicas en las que las células se cultivan mientras se exponen a potentes enzimas digestivas durante periodos largos de tiempo. Cuando las células se exponen a dichas enzimas durante periodos de tiempo excesivos la viabilidad de la suspensión celular disminuye.

También se revela la posibilidad de un método de tratamiento del paciente que requiere un injerto del tejido. Con este método la suspensión celular fabricada conforme al método revelado se aplica a una zona del injerto. Una suspensión líquida que contiene células se puede distribuir manualmente por la zona del injerto mediante cualquiera de las diversas técnicas, que incluyen el pulverizado, pipeteado y pintado.

Preferiblemente, la suspensión se pulveriza sobre la zona del injerto. La suspensión se puede pulverizar a través de cualquier tipo de boquilla que transforme el líquido en pequeñas gotitas suspendidas en el aire. Esta configuración está sometida a dos limitaciones. En primer lugar, no debe someter las células en solución a fuerzas o presiones de cizallamiento que podrían dañar o matar numerosas células. En segundo lugar, no debería requerir que la suspensión celular se mezclara con un fluido impulsor que sea tóxico o dañe las células o los lechos de las heridas. Se dispone de una gran variedad de boquillas que satisfacen ambas limitaciones. Dichas boquillas se pueden conectar de un modo convencional a un recipiente que contenga la suspensión celular.

Alternativamente, la suspensión se puede administrar por medio de una pipeta, los comunes "goteros", jeringas y agujas y otros dispositivos similares que colocarán pequeñas cantidades de suspensión celular en la zona del injerto.

Una vez aplicada la suspensión celular en la zona del injerto receptora, la herida se puede tapar con una gasa. En una configuración preferida la gasa es de nylon hilado Surfsoft™. Preferiblemente, la curación de la herida se realiza siguiendo el protocolo estándar para el tratamiento de un injerto en la piel conocido por los expertos en la materia.

De acuerdo con la invención se dispone de un aparato para desarrollar una suspensión celular a partir de una muestra tisular cutánea, durante el peroperatorio a un paciente, y para aplicar inmediatamente la suspensión celular a una zona del injerto del paciente, que comprende un primer pieza (18), un segundo pieza (30), un grupo de herramientas requeridas para el cultivo celular y una boquilla de pulverización para aplicar la suspensión celular a la zona del injerto, en la que:

(i) La primera pieza (18) incluye:

a) Un medio de calentamiento adecuado para calentar una solución enzimática a una temperatura requerida y que es capaz de mantener esa solución a la temperatura deseada durante un cierto tiempo, donde la solución enzimática precalentada se utiliza para incubar una muestra de tejido cutáneo y contiene una cantidad de enzima suficiente para disociar el estrato celular en la muestra tisular cutánea;

b) Una cavidad para el filtro(28) que comprende un medio de filtración(29) de un tamaño entre 50µm y 200µm, para retirar los congregados celulares de las células cultivadas de la muestra tisular cutánea, para formar la suspensión celular que sea capaz de una dispersión inmediata a la zona del injerto;

c) Al menos un recipiente de retención del líquido(26) para el almacenamiento de una solución de nutriente adecuada para una aplicación directa a la zona del injerto, donde la solución de nutriente se utiliza para suspender las células tras la liberación de las células de la muestra de tejido cutáneo; y

d) Un compartimento de almacenamiento (36) para almacenar el grupo de herramientas requeridas para el cultivo celular; y

(ii) La segunda pieza (30) consta de un recipiente (34) para mantener la muestra tisular cutánea y la solución de nutriente en el depósito de líquido, de manera que el recipiente sea de un tamaño suficiente para permitir la manipulación de la muestra tisular cutánea, permitiendo la separación del estrato celular y cultivando las células del estrato adecuadas para el injerto;

donde la primera pieza (18) dispone de un asiento(38) sobre el cual se puede colocar la segunda pieza(30) durante la manipulación de la muestra tisular cutánea.

5 En una forma preferida de la invención el aparato también incluye una solución de nutriente siendo esta solución capaz de mantener la viabilidad de las células en la muestra tisular.

10 Los depósitos de retención del líquido pueden servir alternativamente como un receptáculo para un recipiente como un vial de plástico o vidrio que guarda la solución nutriente. Preferiblemente el depósito es capaz de contener al menos un volumen de 10 ml. Dichos depósitos permiten la fácil aplicación del fluido a la muestra tisular. El almacenamiento de dichos fluidos o líquidos cerca de su lugar de aplicación tiene también la ventaja de que reduce el riesgo de fuga accidental del fluido y aporta un medio fácil de acceso al fluido para su administración a la muestra tisular o a la suspensión celular.

15 La primera pieza dispone de un compartimento de almacenamiento en el cual se pueden almacenar herramientas y soluciones utilizadas en el método anteriormente descrito. En caso de que el aparato disponga de dicho compartimento, la segunda pieza puede disponer de la tapa o cierre para ese compartimento. En la práctica la tapa se retira preferiblemente de la parte superior del compartimento y se le da la vuelta. El lado inferior de la tapa forma preferiblemente el recipiente lo que permite que la segunda pieza actúe con un objetivo doble. A las herramientas y soluciones utilizadas en el método se puede acceder desde el compartimento. La tapa invertida se podrá colocar de vuelta sobre el compartimento y de ese modo se dispondrá de un recipiente para el aparato.

20 El aparato puede ser de metal, plástico o de cualquier otro material. Además, el recipiente puede ser de cualquier tamaño. Preferiblemente el tamaño del recipiente se encuentra limitado solamente por el uso previsto y las exigencias para su esterilización como el uso de radiación gamma y de óxido de etileno.

25 Se debería observar que el medio de calentamiento empleado en el aparato puede estar formado simplemente por una almohadilla o almohadillas de calentamiento en la parte superior de la primera pieza. Sin embargo, existen problemas auxiliares con dichas disposiciones, entre los cuales está el derrame accidental del recipiente sometido a ese calentamiento. Por lo tanto, en una configuración, uno o más medios de calentamiento pueden estar alojados en una cavidad en la primera pieza. Además en dicha cavidad habrá al menos un recipiente en el cual se puede colocar el tejido para su exposición a la solución enzimática. En una configuración alternativa uno o más medios de calentamiento pueden estar alojados en la base del aparato. En dicha configuración la primera pieza contiene al menos una cavidad adecuada para recibir un recipiente capaz de alojar el líquido y su abertura proporciona el acceso al recipiente del medio de calentamiento.

30 Se observará que si el aparato se ha diseñado para más de un uso el medio de calentamiento puede ser capaz de calentarse y enfriarse de forma reiterada. Cada unidad de calentamiento podrá ser capaz de un único uso, pero el aparato podrá tener múltiples unidades de calentamiento para facilitar múltiples procesos de calentamiento.

35 En una configuración preferida del aparato una arandela de calentamiento se encuentra situada en una cavidad formando una ranura de calentamiento en la primera pieza, en el cual existe un recipiente (por ejemplo, un vial) para la enzima. El recipiente se mantiene preferiblemente en su sitio gracias a un medio de contención, que preferiblemente rodea parte de la zona superior del recipiente impidiendo la liberación accidental del recipiente del aparato. En los casos en los que el aparato se ha previsto para un solo uso el medio de contención puede formar parte de la primera pieza de manera que la eliminación del recipiente únicamente se logra rompiendo físicamente la primera pieza.

40 El medio de calentamiento utilizado en el aparato es controlado preferiblemente por un circuito que permite la activación del elemento de calentamiento cuando se precisa. Por ejemplo, el medio de calentamiento se puede conectar accionando la tecla de inicio situada, por ejemplo, en la superficie de la primera pieza. El medio de calentamiento también se podrá accionar empujando el recipiente hacia abajo con fuerza suficiente para activar un interruptor situado en la base del aparato. Una persona con conocimientos normales en el sector observará que una gama amplia de medios electrónicos se puede utilizar para activar la unidad de calentamiento dispuesta en el aparato.

45 Lo deseable es que la unidad de calentamiento esté unida a un mecanismo de control del tiempo que se adapte para calentar la solución enzimática durante un periodo de tiempo predefinido. En algunas circunstancias cuando se pretende utilizar el aparato para múltiples usos, preferiblemente el temporizador se podrá ajustar para desactivar el elemento de calentamiento una vez se haya alcanzado un periodo de tiempo determinado. En ese momento se podrá activar una alarma que informará al usuario que el tiempo empieza a contar. La alarma puede ser acústica o visual.

50 En otra configuración preferida de la presente invención el medio de calentamiento se dispondrá con un control de la temperatura ajustable. En el momento en que se requiera un ajuste de la temperatura dicha variación se conseguirá adaptando el circuito de control del calentamiento para que incluya o se comuniquen con un mecanismo de control de la temperatura que permita que la temperatura de la unidad de calentamiento se modifique constantemente dentro

de un intervalo constante o bien pueda presentar una gama de temperaturas a las que se pueda ajustar el medio de control del calentamiento. Se incluirá un medio de control de la temperatura en el aparato, es decir en aquel aparato que se vaya a utilizar en la recogida y preparación de diferentes tipos de células o bien donde se utilizan diferentes enzimas en el método de recogida.

5 En una configuración distinta el aparato se ha diseñado para un solo uso. En esos casos el mecanismo del temporizador es parte del circuito que controla el medio de calentamiento. Una vez se ha activado el medio de calentamiento éste calienta la solución durante un periodo predefinido de tiempo y luego se autodestruye. Los expertos en la materia deberían ver que dicho aparato se puede ajustar con varios medios de control capaces de
10 indicar cosas como: la enzima ha alcanzado la temperatura requerida; la cantidad de tiempo que las enzimas han estado en la solución; y/o la cantidad de tiempo restante antes de que el circuito se autodestruya etc... A modo de ejemplo únicamente, el medio de control podría consistir en una serie de LEDs que se activan cuando ocurren ciertos acontecimientos. En una configuración especialmente preferida el elemento de calentamiento se mantiene preferiblemente en el modo de calentamiento durante un máximo de 45 minutos a 1 hora.

15 El medio de calentamiento puede ser accionado por cualquier medio conocido. Preferiblemente pilas/baterías suministran la potencia. En una forma de la invención el suministro de potencia se consigue por una batería o pluralidad de baterías situadas en la base del aparato.

20 En otra configuración de la invención el aparato puede disponer de uno o más medios que faciliten la mezcla de las soluciones empleadas en la invención, como por ejemplo una solución enzimática. A este respecto y a modo de ejemplo solamente el aparato puede incluir un medio para mezclar bien la solución; como por ejemplo un sistema electromagnético que se adapte para agitar una perla magnética. Si el aparato incluye un sistema de mezcla o agitación electromagnético la perla magnética se encontrará preferiblemente en el recipiente (p.ej. vial) en el cual se
25 almacene la solución. Alternativamente la perla magnética se puede añadir a la solución si se desea una agitación.

En una forma altamente preferida de la invención el medio de mezcla o agitación se combina con el medio de calentamiento como una unidad aparte o como unidades aparte para facilitar un calentamiento constante de la solución de una manera continuada. Usando dicho medio de mezcla se evita el sobrecalentamiento de la solución próxima a la unidad de calentamiento mientras se calienta la solución. Dicho sistema proporcionará un calentamiento más constante de la solución. Se conocen medios alternativos para mezclar la solución que incluyen medios mecánicos, físicos, eléctricos y electromagnéticos. Mientras se pueda emplear cualquier medio de mezcla en el aparato, el medio de mezcla se seleccionará preferiblemente para minimizar la vibración del aparato o se
30 incorporará al aparato de tal modo que minimice dicha vibración. A este respecto los medios de agitación se podrán alojar en uno o más amortiguadores de la vibración, o el aparato podrá incluir uno o más amortiguadores de la vibración en su base.

35 Al incorporar un medio de agitación al aparato el medio puede ser activado automáticamente al activar la unidad de calentamiento o bien alternativamente puede existir un sistema de activación aparte. Además, la velocidad de la mezcla puede ser fija o variable. Preferiblemente, se dispone de un sistema de activación aparte para el medio de mezcla.

40 La cavidad del filtro incorporada al aparato puede ser de un tamaño o forma que facilite el filtrado de una suspensión celular. Además la cavidad se puede adaptar para recibir y mantener al menos un tubo al cual se filtrará la suspensión celular. Preferiblemente la cavidad tiene una base cónica que permite un acceso fácil de todo el volumen de la suspensión celular una vez filtrada.

45 Es deseable que la tercera cavidad tenga un diseño para recibir un filtro celular de 100µm. La tercera cavidad puede acomodar un filtro celular de 100µm conectado a un tubo cónico. Preferiblemente, el tubo tiene unas graduaciones o marcas de área/volumen en sus paredes.

50 El aparato incluye un conjunto de herramientas requeridas para el cultivo celular. Los expertos en la materia observarán que aquellas herramientas necesarias para el cultivo celular deben estar incluidas en el dispositivo. Preferiblemente las herramientas son estériles. Solo a modo de ejemplo, el grupo de herramientas puede incluir un recipiente de vidrio para la exima de separación; una solución estéril para la suspensión de la enzima; una solución estéril de nutriente; escalpelo; fórceps; jeringa; gotero, filtro celular; gasas para heridas y/o boquillas de pulverización. En una configuración muy preferida, el conjunto de herramientas se almacenará en un compartimento creado en la primera pieza o elemento del aparato, que está cubierto por la segunda pieza cuando no se utiliza.

55 En una configuración especialmente preferida, el dispositivo se utiliza para cultivar una suspensión de células y aplicar las células a una zona receptora del modo siguiente.

60 Una parte alícuota del agua estéril se mezcla con una parte de enzimas de separación liofilizadas y se coloca en la ranura de sujeción de calentamiento. El medio de calentamiento se activa luego y calienta el contenido (es decir la solución enzimática) del recipiente a una temperatura de trabajo entre 30 y 37°C, preferiblemente entre 33 y 37°C y a modo de ejemplo a 37°C durante 2 minutos y mantiene la temperatura de trabajo durante al menos 45 minutos.

Una vez se ha alcanzado una temperatura de trabajo se coloca una muestra del tejido tomado de una zona donante en la solución enzimática y se incuba a la temperatura de trabajo. La muestra tisular se incuba entre 5 y 45 minutos. Los expertos en la materia observarán que el tiempo para conseguir la separación de las capas de la muestra tisular depende del grosor y del tamaño de la muestra tisular y de la temperatura de incubación. Una vez se consigue la separación enzimática de las capas de tejido, la muestra tisular se retira y las capas tisulares se separan usando instrumentos quirúrgicos.

Un parte alícuota de la segunda solución medida con mucho cuidado se extrae entonces del recipiente de retención del fluido mediante su aspiración en una jeringa y luego se aplica a las capas. Las células entre las capas de tejido son rascadas y suspendidas y se mezclan con la solución de nutriente. La suspensión celular se recoge utilizando preferiblemente una jeringa y una cánula.

La suspensión de células cultivada se pasará luego a través de un filtro celular situado en la cavidad del filtro y la suspensión filtrada de células se recoge en la cavidad del filtro. El recipiente se podrá lavar con un volumen adicional de la segunda solución y esta suspensión de células resultante se podrá filtrar y recoger en la cavidad del filtro.

La suspensión filtrada de células puede ser aspirada por la jeringa y aplicada en la zona receptora.

20 MEJORES MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

En los siguientes ejemplos no restrictivos se describen con más detalle las características de la presente invención. No obstante, se entiende que esta descripción detallada se incluye únicamente a modo de ejemplo de la presente invención. De ningún modo se debería entender como una restricción en la amplia descripción de la invención que se indica a continuación.

Ejemplo 1

Preparación de la zona receptora

Para optimizar el éxito del injerto cutáneo, la herida se limpiaba y se comprobaba si era de la profundidad apropiada. Además, se realizaba una hemostasia sanguínea y se verificaba si en la herida existía celulitis orbitaria o infección. Las técnicas para preparar la zona incluían una disección aguda, dermoabrasión o tratamiento con láser.

Biopsia de la zona donante

Se elegía la zona donante para que coincidiera de forma apropiada con la zona receptora. La zona donante se infiltraba con anestésico local y adrenalina bajo la piel cerca del tejido subcutáneo. Esto hacía que la zona donante fuera firme y ayudará a realizar la biopsia de grosor delgado. Las dimensiones de la biopsia eran determinadas por el tamaño de la zona receptora que se debía recubrir.

Normalmente el tamaño de la biopsia tiene una relación de expansión de 1:10-1:80. En este caso, se tomaba un tamaño de biopsia de 2 cmx2cm de la zona donante lo que daba una relación o índice de expansión de 1:60.

Revestimiento celular usando la técnica rápida

El tratamiento de la herida se llevaba a cabo usando la técnica Re-Cell® Rapid en el aparato del cultivo celular, que se explica con más detalle en el ejemplo 2. El aparato contenía todos los instrumentos, soluciones, enzimas y apósitos para el tratamiento de la herida.

El elemento de calentamiento se activaba al soltar el "botón de inicio". La solución (agua estéril para la inyección)(10 ml) era transferida del recipiente de plástico marcado con solución A al vaso de vidrio que contenía la enzima de separación (tripsina liofilizada) para conseguir una concentración final del 0,5% de tripsina. La solución enzimática se mezclaba y se transfería a un recipiente que ya se encontraba en la cavidad del elemento de calentamiento y se calentaba a 37°C.

La solución B(medio nutriente) del vaso suministrado se trasladaba al depósito de retención de fluidos.

La muestra tisular obtenida con anterioridad se colocaba entonces en la solución enzimática y se incubaba a 37°C entre 10 y 15 minutos. Transcurrido este tiempo, la muestra tisular se retiraba de la solución enzimática con un par de fórceps, se lavaba sumergiéndola en el pozo de contención de fluido que contenía la solución B y se colocaba con la parte dérmica hacia abajo y el lado epidérmico hacia arriba.

Luego la solución B se aspiraba por medio de una jeringa y se vertía gota a gota sobre ambas capas de la biopsia.

Las capas cutánea se separaban usando fórceps. Esto permitía el acceso a la zona de la unión dérmica-epidérmica de ambas superficies. Las células se rascaban de las superficies para desarrollar una nube de células en el recipiente. Luego las células se mezclaban con la solución B. La nube o el penacho de células era aspirado por la jeringa gracias a una cánula de calibre 19.

El filtro suministrado (filtro celular de 100 μm) se acoplaba a la cavidad del filtro y el penacho de células de la solución B se hacía pasar a través del filtro. Otra pequeña cantidad de solución B se utilizaba luego para lavar el recipiente (por ejemplo, una cápsula de Petri) y se recogían las células que quedaban que también se hacían pasar por el filtro.

5 La suspensión de células resultante recogida en la cavidad cónica era aspirada por la jeringa y se acoplaba una boquilla a la jeringa para pulverizar dicha solución sobre la zona de la herida.

10 La herida se revisaba para ver si estaba limpia y no quedaban restos ni evidencia de contaminación bacteriana. Además se verificaba si había hemostasia en la herida. Una vez lista la zona receptora, se aplicaba la suspensión de células a la superficie de la herida usando la boquilla.

15 La herida se curaba con el apósito de nylon hilado Surfsoft™, que se entregaba con el aparato. La curación de la herida se completaba usando los protocolos estándar para el tratamiento de un injerto cutáneo.

Ejemplo 2

20 La configuración que se muestra en la figura 1 hace referencia a un aparato 10 para el cultivo celular mediante la técnica Re-Cell® Rapid que se utilizará en la preparación de una suspensión celular trasplantable de tejido vivo adecuado para efectuar un injerto en un paciente.

25 Tal como se muestra en la figura 1 el aparato incluye una tapa de cierre 12 que dispone de un mecanismo de bloqueo 14 adaptado para acoplar una parte de la base 16. El mecanismo de cierre o bloqueo 14 dispone de un medio para cerrar el aparato 16 cuando no se utiliza. Situado en la parte de la base 16 hay una primera pieza 18 en el cual existe una abertura 20 en la cual se ha colocado un vial 22 para el enzima. Adyacente a la abertura existe un interruptor de activación 24 capaz de activar el medio de calentamiento (no mostrado). La primera pieza dispone también de un depósito de retención de fluidos 26 y de una cavidad del filtro 28. Tal como se ha presentado en esta figura el filtro 29 se encuentra en la cavidad del filtro. Normalmente el filtro es un elemento opcional que se incluye como pieza aparte en el aparato.

30 La abertura 20 en la primera pieza 18 tendrá preferiblemente un diámetro tal que permita que el cuello del vial 22 sobresalga por encima de la primera pieza 18. La periferia de la abertura 20 se ajusta con una arandela 21 que es ligeramente inferior al diámetro del cuerpo del vial 22. Por consiguiente cuando se utiliza el vial 22 no se puede sacar del aparato 10 pues está fijado en su sitio por la arandela 21 situada alrededor de la periferia de la abertura 20.

35 Junto a la abertura 20, el depósito de retención de fluidos 26 y la cavidad del filtro 28 se encuentra la segunda pieza 30 que está situada sobre un asiento (no mostrado) colocado en un compartimento de almacenamiento (no mostrado) en la primera pieza 18. Al darse la vuelta la segunda pieza 30 forma un receptáculo en el cual se pueden realizar las manipulaciones del tejido. Para facilitar la separación de la segunda pieza 30 de la primera pieza 18 se dispone de un hueco 32 en el lateral de una parte de la segunda pieza 30, que tiene un tamaño tal que una persona puede levantar la segunda pieza del asiento sobre el que descansa en la primera pieza 18.

40 En la cavidad del filtro 28 hay un filtro 29 (dispuesto aparte con los demás componentes), que tiene una malla que es capaz de separar el material celular mayor de 100 μm de un sobrenadante celular.

45 La figura 2 proporciona una visión en perspectiva parcialmente explosionada del aparato 10 en el que la segunda pieza 30 está separada de la primera pieza 18 y además está invertida. La inversión de la segunda pieza 30 muestra las paredes laterales 32 de la segunda pieza 30, que forman la barrera de contención del fluido del recipiente y una zona de almacenamiento 34 en la que se pueden efectuar manipulaciones del tejido.

50 La separación de la segunda pieza 30 de la primera pieza 18 revela además un compartimento de almacenamiento 36 en la primera pieza 18 en el cual se pueden guardar soluciones y herramientas cuando el aparato 10 no se utiliza. En el compartimento de almacenamiento 36 hay un asiento 38 sobre el cual se puede colocar la segunda pieza 30. El asiento 38 está situado preferiblemente alrededor de la periferia del compartimento de almacenamiento 36 bastante por debajo de la superficie de la primera pieza 18, a una distancia que es equivalente a la altura de las paredes laterales 32 de la segunda pieza 30.

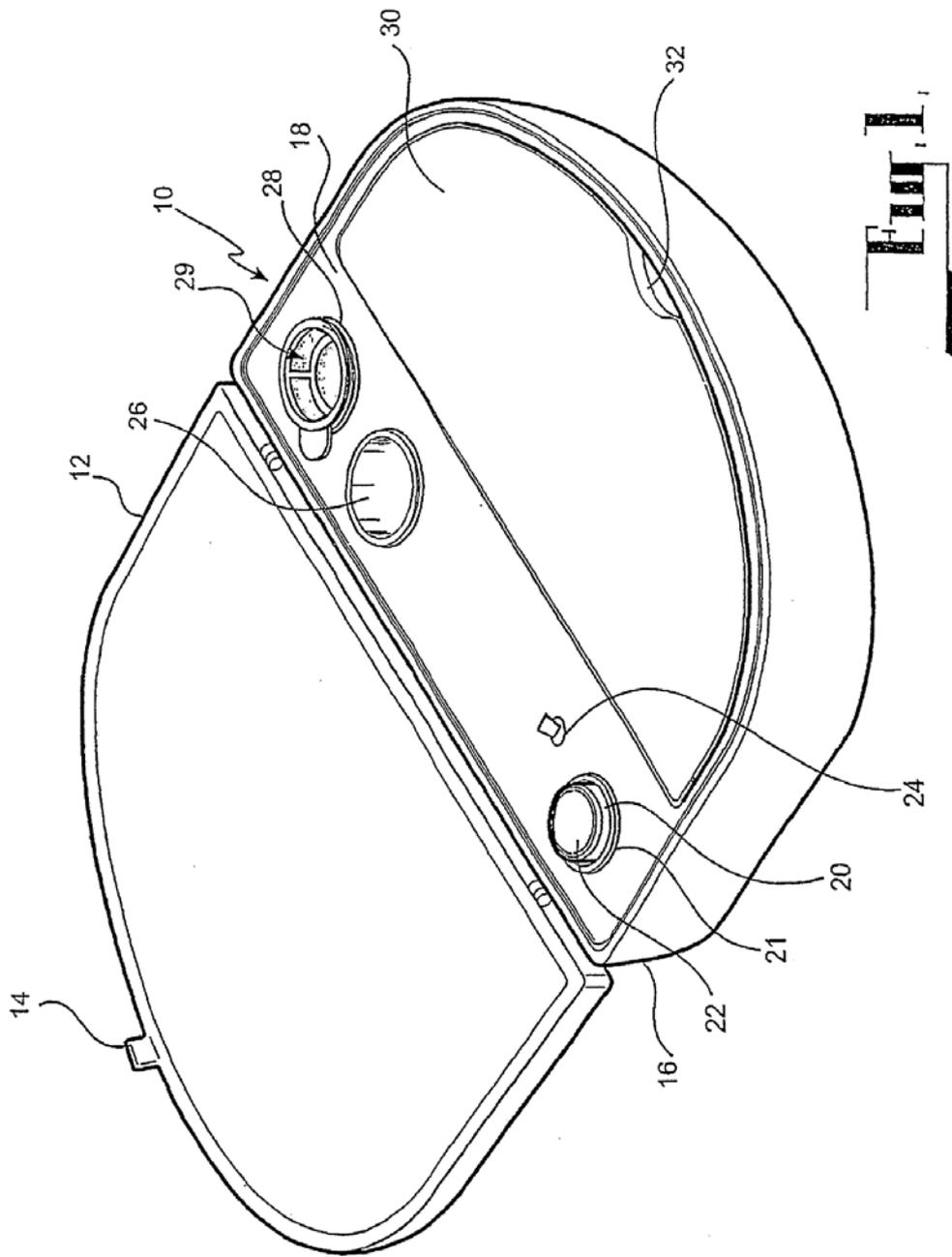
55 La figura 3a muestra una visión en perspectiva de la primera pieza 18 donde se puede ver el compartimento de almacenamiento 36, el interruptor de activación del calentador 24, la abertura 20, el depósito de retención de fluidos 26 y cavidad del filtro 28 formada en la primera pieza. La figura 3b proporciona una visión posterior de la primera pieza 18 mostrando la cavidad del filtro 28, el depósito de retención del fluido 26, el interruptor que activa el calentador 24, la arandela de apertura 21 y la pared posterior del compartimento de almacenamiento 36. Tal como se puede ver en esta figura, la cavidad del filtro tiene una base cónica de manera que dispone de un medio para un acceso fácil a la suspensión celular que es filtrada por el mismo. Justo al lado del recipiente de retención de fluidos y en el lado opuesto al recipiente de retención del filtro se dispone un elemento 40 que sirve para fijar las baterías y que sobresale hacia la base 16 del aparato (no mostrado) y tiene un medio para fijar las baterías.

- 5 La figura 4 equivale a una visión en perspectiva de la base 16 del aparato 10, que muestra el vial 22 situado dentro de un campo de contención 42. Entre el campo de contención 42 y el vial 22 se dispone una arandela 44 de calentamiento que rodea el cuerpo del vial. Adyacente al campo de contención hay una tarjeta de circuito impreso 46, que se mantiene en una posición con ayuda de unos medios de contención 48, 50 y 52. Dicha tarjeta de circuito impreso 46 está comunicada con la arandela de calentamiento 44 por medio de unos cables 54. La tarjeta de circuito impreso está conectada también mediante unos cables 58 con el interruptor que activa el calentador (no mostrado). Adyacente a la tarjeta de circuito impreso 46 hay un medio de contención de las baterías 58, que tiene 4 baterías AA en una posición inamovible (no mostrada). Las baterías están en contacto eléctrico con la tarjeta del circuito impreso 46 mediante cables 60. Cuando la primera pieza 18 se fija a la base 16 las baterías se mantienen en su sitio gracias al medio de contención 58, el medio de colocación de las baterías 40 y la base de cada depósito de retención de fluidos 26 y cavidad del filtro 28. Preferiblemente la base cónica de la cavidad del filtro 28 sobresale entre las baterías lo que aporta un medio adicional para fijar las baterías en una posición inamovible.
- 10
- 15 Las modificaciones y variaciones de los métodos descritos y del dispositivo de la invención son evidentes para los expertos en la materia y no se apartan del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito con unas configuraciones preferidas específicas, se debería entender que la invención reivindicada como tal no se debería limitar de forma indebida a dichas configuraciones específicas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un aparato para desarrollar una suspensión celular de una muestra tisular cutánea durante el perioperatorio de un paciente y para la aplicación inmediata de la suspensión celular a una zona trasplantada del paciente, que consta de una primera pieza(18), una segunda pieza (30), un grupo de herramientas requeridas para el cultivo celular y una boquilla de pulverización para aplicar la suspensión celular a la zona trasplantada, donde
- 10 (i) La primera pieza (18) del aparato incluye:
- 15 (a) Un medio de calentamiento adecuado para calentar una solución enzimática a una temperatura requerida y que es capaz de mantener esa solución a la temperatura deseada durante un cierto tiempo, donde la solución enzimática precalentada se utiliza para incubar una muestra de tejido cutáneo y contiene una cantidad de enzima suficiente para disociar el estrato celular en la muestra tisular cutánea;
- 20 (b) Una cavidad del filtro(28) que comprende un medio de filtración(29) de un tamaño de filtración entre 50µm y 200µm, para eliminar los congregados celulares de las células cultivadas de la muestra tisular cutánea, para formar la suspensión celular que sea capaz de una dispersión inmediata a la zona del injerto;
- 25 (c) Al menos un depósito de retención de fluidos (26) para el almacenamiento de una solución de nutriente adecuada para una aplicación directa a la zona del injerto, donde la solución de nutriente se utiliza para suspender las células tras la liberación de las células de la muestra de tejido cutáneo; y
- (d) Un compartimento de almacenamiento (36) para almacenar el grupo de herramientas requeridas para el cultivo celular; y
- (ii) La segunda pieza (30) consiste en un recipiente (34) para retener la muestra tisular cutánea y la solución de nutriente en una contención de fluidos, de manera que el recipiente sea de un tamaño suficiente para permitir la manipulación de la muestra tisular cutánea, permitiendo la separación de los estratos celulares y el cultivo de las células del estrato adecuado para el trasplante;
- donde la primera pieza (18) dispone de un asiento (38) en el cual se puede colocar la segunda pieza (30) durante la manipulación de la muestra tisular cutánea.
- 30 2. El aparato conforme a la reivindicación 1, donde el elemento de calentamiento está alojado en una cavidad en la primera pieza.
3. El aparato conforme a la reivindicación 2, en el que la cavidad contiene además un recipiente en el cual se puede colocar la muestra tisular cutánea para entrar en contacto con la solución enzimática.
- 35 4. El aparato conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el medio de calentamiento es controlado por un circuito que permite la activación del medio de calentamiento cuando se precise.
- 40 5. El aparato conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el medio de calentamiento está unido a un temporizador de forma operativa, para calentar la solución enzimática durante un periodo de tiempo predefinido.
- 45 6. El aparato conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el medio de calentamiento se dispone con un control de la temperatura ajustable.
- 50 7. El aparato conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un medio de control que es capaz de indicar que la enzima ha alcanzado la temperatura requerida, y/o la cantidad de tiempo que la enzima ha estado en la solución enzimática.
8. El aparato conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además un medio para facilitar la mezcla de la solución enzimática.
9. El aparato conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la cavidad del filtro se ha adaptado para recibir y sujetar al menos un tubo en el cual se puede filtrar la suspensión celular.
- 55 10. El aparato conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el depósito de retención de fluidos sirve de receptáculo para un recipiente que guarda la solución de nutriente.
- 60 11. El aparato conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde la segunda pieza o elemento del aparato dispone de una tapa para el compartimento de almacenamiento.
- 65 12. El aparato conforme a la reivindicación 11, donde el lateral inferior de la tapa forma el recipiente, lo que permite que la segunda pieza tenga un doble objetivo.
13. El aparato conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-12, donde el grupo de herramientas incluye un vaso de cristal de la enzima, una solución estéril para la suspensión de la enzima, una solución de nutriente estéril, escalpelo, fórceps, jeringa, gotero, filtro celular, apósitos y/o boquillas de pulverización.

14. El aparato conforme a cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde el medio de calentamiento calienta la solución enzimática a una temperatura de trabajo entre 30 y 37°C, preferiblemente entre 33 y 37°C.
- 5
15. El aparato conforme a la reivindicación 14, donde el medio de calentamiento mantiene la temperatura de trabajo durante al menos 45 minutos.



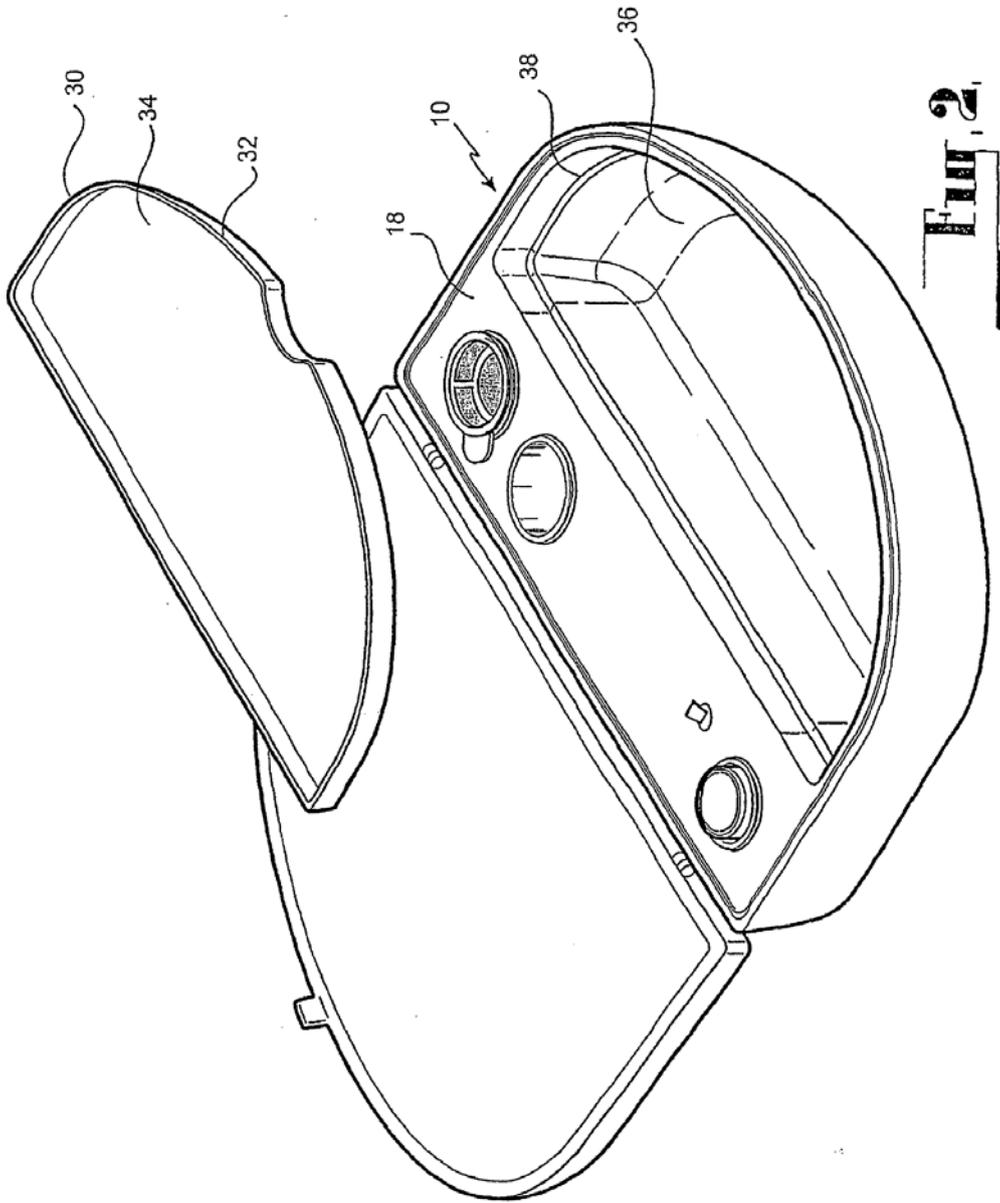


Fig. 2

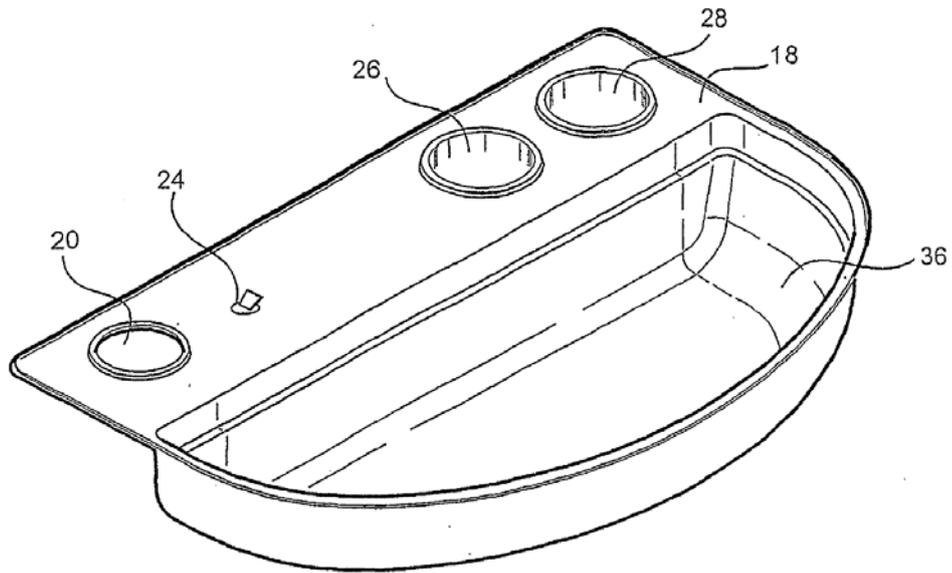


Fig. 3a.

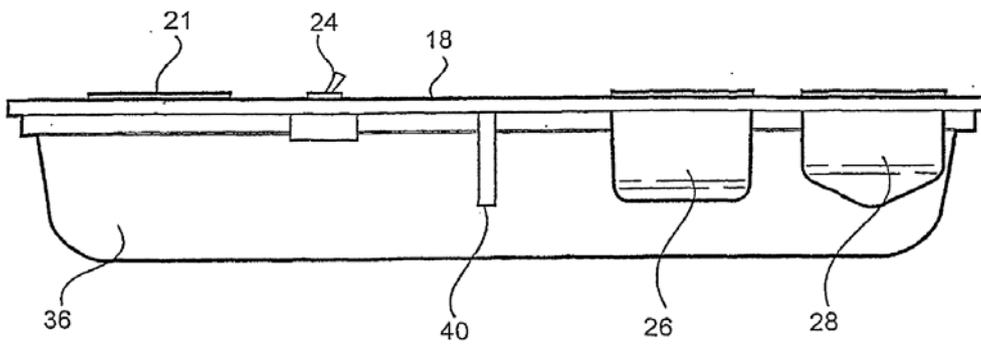


Fig. 3b.

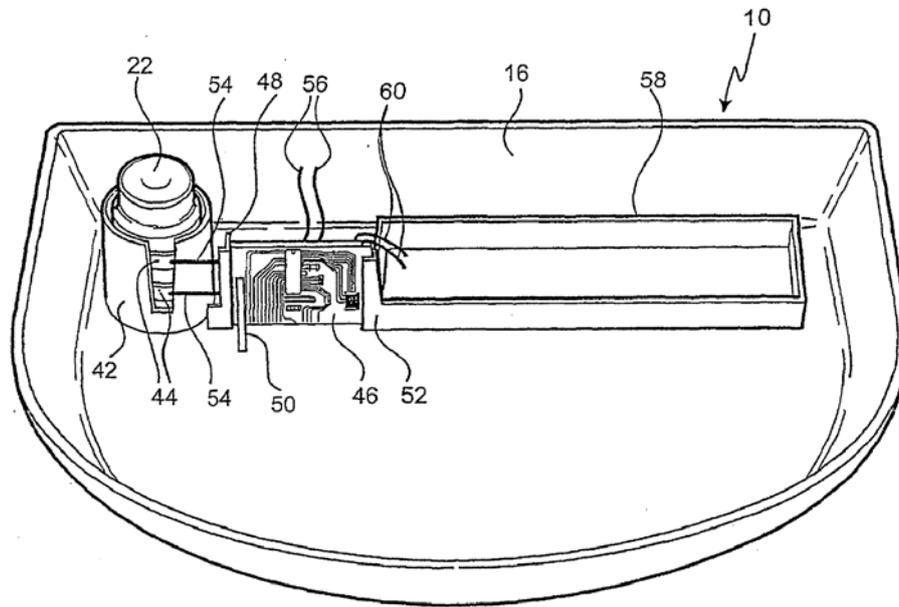


Fig. 4