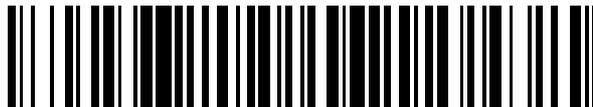


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 436**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/407** (2015.01)

**A61K 35/14** (2015.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2007 PCT/GB2007/004201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2008 WO08065334**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2007 E 07824439 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2083835**

54 Título: **Composiciones de apósito para heridas que contienen lisado de células no viables**

30 Prioridad:

**30.11.2006 GB 0623964**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.07.2017**

73 Titular/es:

**SYSTAGENIX WOUND MANAGEMENT IP CO. B.V.  
(100.0%)  
Prins Bernhardplein 200  
1097 JB Amsterdam, NL**

72 Inventor/es:

**CLARK, RACHAEL LOUISE;  
CULLEN, BRED A MARY y  
MATHESON, LINDSAY**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 625 436 T3

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

### Descripción

Composiciones de apósito para heridas que contienen lisado de células no viables

#### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones de apósito para heridas que comprenden un lisado de células enteras no viables derivadas de células de macrófagos, a métodos de fabricación de tales composiciones y a apósitos y a los usos de los apósitos de heridas para la curación de heridas.

#### Antecedentes de la invención

10 El documento US-A-6.585.969 describe el uso de hojas de queratinocitos cultivadas en la curación de heridas. El documento WO-A-2004050121 se refiere a una composición farmacéutica que comprende un lisado de células de queratinocitos no viables y un agente antisedimentación. La eficacia de estos apósitos para heridas puede atribuirse a sustancias, tales como factores de crecimiento, presentes en los queratinocitos cultivados. Muchas citocinas y factores de crecimiento conocidos, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante alfa (TGF-alfa), factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) influyen en los queratinocitos y fibroblastos de la piel. Por ejemplo, TGF-beta, EGF y FGF inducen la proliferación de queratinocitos. TGF-beta y PDGF estimulan la síntesis de colágeno y otros componentes del tejido conectivo. Debido a estas propiedades, tales factores de crecimiento pueden desempeñar un papel en la promoción de la curación de heridas y la regeneración epidérmica. Por lo tanto, el uso de un cultivo celular o un liberador de células o lisado que contiene tales factores de crecimiento puede ser beneficioso para promover la curación de heridas.

20 El documento GB-A-2350565 describe un apósito para heridas que comprende mitocondrias, y que no contiene orgánulos celulares distintos a las mitocondrias, para el tratamiento de heridas crónicas.

El documento US-A-5324508 describe la inhibición de la formación de tejido cicatricial usando monocina de macrófagos purificada.

25 El documento EP-A-0109089 describe la administración de ciertos moduladores, extraídos del lisado celular, del sistema inmune humano para la supresión de la dermatitis de contacto.

M. Huttunen et al. "Inhibition of keratinocyte growth in cell culture and whole skin culture by mast cell mediators", *Experimental Dermatology*, vol. 10, 2001, págs. 184-192, proporciona un estudio in vitro del efecto de un lisado de línea celular HMC-1 sobre la proliferación de queratinocitos y el crecimiento epitelial.

30 Sin embargo, un problema del uso de tales lisados celulares para tratar heridas es que las heridas contienen proteasas, que pueden degradar los factores de crecimiento útiles. El nivel de proteasas endógenas es especialmente elevado en heridas crónicas, tales como úlceras. Por lo tanto, no se logra el efecto total de tales lisados.

35 Los presentes inventores han encontrado que un lisado/liberado de macrófagos o hepatocitos promueve la proliferación de fibroblastos in vitro, incluso en presencia de fluidos de la herida crónicos. Se cree que este efecto puede ser debido a la presencia en estos lisados y liberaciones de inhibidores de proteasa tales como alfa-1-antitripsina, además de factores de crecimiento. Por lo tanto, se espera que la eficacia de estos lisados y liberaciones como apósitos para heridas o en estos sea mayor que la de los apósitos de queratinocitos descritos anteriormente.

40 De acuerdo con esto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición de apósito para heridas como se define en la reivindicación 1.

45 Las células inflamatorias incluyen macrófagos, monocitos, linfocitos, mastocitos, neutrófilos, células T y células plasmáticas. La célula inflamatoria de la invención es un macrófago. Los macrófagos son células que se originan a partir de glóbulos blancos específicos, llamados monocitos. Los macrófagos maduran a partir de los monocitos producidos en la médula ósea. Los monocitos y los macrófagos son fagocitos, actuando tanto en la defensa no específica como en la inmunidad mediada por células de animales vertebrados.

Los hepatocitos constituyen el 60-80% de la masa citoplasmática del hígado. El hepatocito es la única célula en el cuerpo que fabrica albúmina, fibrinógeno y el grupo protrombina de factores de coagulación. Es el sitio principal para la síntesis de lipoproteínas, transferrina y glicoproteínas. Los hepatocitos fabrican sus propias proteínas estructurales y enzimas intracelulares.

50 El lisado de células enteras no viables utilizado para la presente invención puede comprender componentes de células distintas a los macrófagos. Sin embargo, preferiblemente al menos aproximadamente el 1%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 10%, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 30% y lo más preferiblemente aproximadamente el 50% o más de las células usadas para preparar el lisado son macrófagos.

- El término "lisado celular" se refiere a suspensiones celulares o fracciones de las mismas, obtenidas por lisis de las células. El lisado de células completo contiene todas las proteínas y otras moléculas que estaban destinadas a permanecer como intracelulares y las destinadas a ser secretadas extracelularmente. Los lisados celulares comprenden una mezcla extremadamente compleja de constituyentes tales como proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos, etc. Todos estos componentes pueden interactuar entre sí. El lisado celular en la solución o suspensión de la presente invención puede comprender células completas, partes de células o cualesquiera fracciones o mezclas de las mismas obtenidas después de una etapa de lisis. La expresión "liberado de células" se refiere a aquellas proteínas y otras moléculas que se secretan extracelularmente. Por tanto, el liberado puede considerarse como una fracción del lisado.
- El lisado de células enteras no viables se obtiene a partir de células enteras mediante cualquiera de los diversos procesos de lisis celular que son bien conocidos por los expertos en la técnica. La expresión "lisis celular" se refiere a la ruptura de la pared celular y/o la membrana celular de las células mediante un tratamiento químico, biológico, mecánico o térmico. Numerosos métodos mecánicos de lisis han sido desarrollados y publicados. Incluyen la presión, cavitación, ondas sonoras o ultrasónicas, agitación mecánica o molido. Los lisados celulares pueden obtenerse adecuadamente por homogeneización mecánica de las células.
- Los lisados de células enteras de macrófagos no viables de la presente invención pueden obtenerse preferiblemente sometiendo la suspensión de células a ciclos múltiples de congelación-descongelación, lo cual altera la membrana celular liberando de este modo los componentes celulares en solución.
- Las células enteras pueden ser aislados primarios de tejido humano, o las células pueden obtenerse a partir de una colección de cultivo tal como la colección de cultivos de tejidos europea o la colección de cultivos de tejidos americana. Una vez que se compra o adquiere un vial de células, se puede expandir y congelar el stock mantenido indefinidamente utilizando técnicas normales de cultivo celular.
- Pueden obtenerse fracciones de lisado de células enteras útiles mediante lisis de células enteras, sometiendo el lisado resultante a centrifugación en el que ciertas partes del lisado de células enteras resultante están en la fracción de gránulos y ciertas otras partes del lisado de células enteras resultante están en el sobrenadante.
- El lisado de células enteras se prepara adecuadamente mediante la lisis de una composición celular, tal como una suspensión celular acuosa, que contiene más de aproximadamente  $2 \times 10^5$  células/ml, por ejemplo de  $0,25 \times 10^6$  a aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/ml, preferiblemente de aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml. La concentración del lisado de células enteras en una composición de la presente invención varía de acuerdo con el tipo de lisado de células enteras en la composición, así como según su uso previsto.
- Los liberados comprenden proteínas y otras moléculas, cuya célula intacta segrega durante su ciclo de crecimiento normal. Por lo tanto, el liberado es una sub-fracción del lisado de células enteras. El liberado se prepara cultivando las células in vitro y recolectando los medios acondicionados en diferentes momentos, por ejemplo a las 24 ó 48 horas. Los medios acondicionados contienen las proteínas, cuyas células secretarían normalmente extracelularmente para llevar a cabo sus funciones específicas. Adecuadamente, las células crecen a una densidad celular de aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/ml y los liberados se recuperan después de 24 horas de crecimiento.
- Los lisados de células enteras se pueden usar directamente, por ejemplo en suspensión acuosa o en forma liofilizada. Sin embargo, en la mayoría de las composiciones de acuerdo con la presente invención, el lisado de células enteras se dispersa en o sobre un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede ser líquido, semisólido (por ejemplo, un ungüento o un gel) o sólido. Preferiblemente, las composiciones de la invención son adecuadas para su aplicación tópica a heridas. Preferiblemente, las composiciones de la invención son sustancialmente estériles.
- Los vehículos líquidos o semisólidos pueden ser cualesquiera vehículos adecuados para soportar el lisado de células enteras en la solución o suspensión. Ejemplos de tales vehículos líquidos son agua, aceite o emulsiones (tales como emulsiones de agua en aceite o de aceite en agua) y otros líquidos similares.
- Las composiciones sólidas de acuerdo con la presente invención pueden estar en forma de geles, perlas, escamas, polvos y, preferiblemente, en forma de una película, una almohadilla fibrosa, una banda, una tela tejida o no tejida, una esponja liofilizada, una espuma, o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el material se selecciona del grupo que consiste en telas tejidas, tejidos de punto y telas no tejidas, todas las cuales pueden ser hechas por métodos convencionales. En otras realizaciones, el material puede comprender (o consistir esencialmente en) una esponja liofilizada o una esponja secada en un disolvente.
- El vehículo sólido puede ser bioabsorbible o no bioabsorbible. El término "bioabsorbible" se refiere a un material que está completamente degradado y absorbido in vivo en el cuerpo de un mamífero.
- Los materiales no bioabsorbibles adecuados incluyen materiales textiles comunes tales como celulosa, celulosa procesada tal como viscosa, poliamida, poliuretano, y también alginatos.

Los materiales bioabsorbibles adecuados incluyen aquellos seleccionados del grupo que consiste en colágenos, derivados de celulosa bioabsorbibles tales como celulosas oxidadas, galactomananos tales como guar/borato, glicosaminoglicanos tales como hialuronatos reticulados, quitosanos, polímeros y copolímeros poliláctidos y poliglicolidos, polihidroxibutiratos y mezclas de los mismos.

- 5 Preferiblemente, la composición sólida de acuerdo con la presente invención comprende, o consiste esencialmente en, una esponja bioabsorbible liofilizada. En los documentos EP-A-1153622 y EP-A-0838491 se describen métodos adecuados para preparar esponjas secadas por liofilización y secadas con disolventes.

10 En ciertas realizaciones preferidas, el vehículo comprende (y puede consistir esencialmente en) un material sólido bioabsorbible seleccionado del grupo que consiste en colágenos, quitosanos, celulosas oxidadas y mezclas de los mismos.

15 La celulosa oxidada se produce por la oxidación de la celulosa, por ejemplo, con tetróxido de dinitrógeno. Este proceso convierte a los grupos de alcohol primario en los residuos de sacárido en un grupo de ácido carboxílico, formando residuos de ácido urónico dentro de la cadena de celulosa. La oxidación no continúa con selectividad completa, y como resultado los grupos hidroxilo sobre los carbonos 2 y 3 se convierten ocasionalmente en la forma ceto. Estas unidades de cetona introducen un enlace lábil al álcali, el cual a pH 7 o superior inicia la descomposición del polímero a través de la formación de una lactona y la escisión del anillo de azúcar. Como resultado, la celulosa oxidada es biodegradable y bioabsorbible en condiciones fisiológicas.

20 La celulosa oxidada preferida para aplicaciones prácticas es celulosa regenerada oxidada (ORC) preparada por oxidación de una celulosa regenerada, tal como rayón. Se sabe desde hace algún tiempo que la ORC tiene propiedades hemostáticas y que la aplicación de tejido ORC puede usarse para reducir la extensión de las adherencias postquirúrgicas en la cirugía abdominal.

25 La celulosa regenerada oxidada (ORC) puede obtenerse por el procedimiento descrito en la Patente de EE.UU. 3122479. Este material ofrece numerosas ventajas incluyendo las características de que es biocompatible, biodegradable, no inmunogénico y fácilmente disponible comercialmente. La ORC está disponible con diversos grados de oxidación y, por lo tanto, tasas de degradación. La ORC se puede usar en forma de fibras insolubles, incluyendo telas tejidas, no tejidas y tejidas de punto.

30 La quitina es un biopolímero natural compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina. La quitina puede ser extraída de la cáscara externa de camarones y cangrejos de una manera conocida. La quitina se desacetila parcialmente, por ejemplo, por tratamiento con NaOH 5M-15M, para producir quitosano. La desacetilación completa de la quitina no es una posibilidad práctica, pero preferiblemente el quitosán está desacetilado al menos en un 50%, más preferiblemente al menos un 75% desacetilado. El quitosano se ha empleado para el tratamiento de heridas en diversas formas físicas, p. ej. como una solución/gel; película/membrana; esponja; polvo o fibra. El quitosano, en forma de base libre, es hinchable pero no sustancialmente soluble en agua a pH casi neutro, pero soluble en ácidos debido a la presencia de grupos amonio en la cadena de quitosano. La solubilidad del quitosano puede reducirse mediante reticulación, por ejemplo, con epiclorhidrina. Típicamente, el peso molecular medio del quitosano determinado por cromatografía de permeación en gel es de aproximadamente  $10^5$  a aproximadamente  $10^6$ .

35 El colágeno útil como sustrato sólido en los materiales de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier colágeno, incluyendo colágeno Tipo I o Tipo II o Tipo III, colágeno fibroso natural, atelocolágeno, colágenos parcialmente hidrolizados tales como gelatina y combinaciones de los mismos. Puede usarse el colágeno humano recombinante, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. US-A-5.962.648 y el documento WO-A-2004078120. Es adecuado el colágeno fibroso natural, por ejemplo, de origen bovino. Por ejemplo, el colágeno preparado a partir de piel bovina es una combinación de colágeno tipo I (85%) y colágeno tipo III (15%).

40 En ciertas realizaciones de la presente invención, la celulosa oxidada se compleja con colágeno y/o quitosano para formar estructuras del tipo descrito en los documentos WO98/00180, WO98/00446 o WO2004/026200. Por ejemplo, la celulosa oxidada puede estar en la forma de fibras de ORC molturadas que se han dispersado en una suspensión acuosa de colágeno y luego se han liofilizado o secado con disolvente para formar una esponja bioabsorbible. Esto proporciona ciertos efectos terapéuticos y sinérgicos que surgen de la complejación con colágeno, como se describe en las especificaciones de patente mencionadas anteriormente.

45 En realizaciones particulares, el sustrato polimérico comprende (y puede consistir esencialmente en) una mezcla de: (a) colágeno y/o quitosano; y (b) celulosa regenerada oxidada, por ejemplo, en un intervalo de relación en peso seco de aproximadamente 90:10 a aproximadamente 10:90 de colágeno/quitosano:ORC, preferiblemente de aproximadamente 75:25 a aproximadamente 25:75, y particularmente de aproximadamente 60:40 a aproximadamente 40:60.

50 El lisado de células enteras se dispersa en, y/o sobre, la superficie del vehículo sólido en una concentración terapéuticamente eficaz. Es decir, a una concentración que da como resultado un aumento de la proliferación de fibroblastos en relación con un control sin lisado de células enteras, según se determina mediante el Procedimiento 1 a continuación.

Las composiciones sólidas para curar heridas de acuerdo con la presente invención son adecuadamente sustancialmente secas. En ciertas realizaciones, pueden comprender hasta aproximadamente 20% en peso, preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 10% en peso de agua. Las composiciones sólidas de acuerdo con la presente invención también pueden contener 0-40% en peso, por ejemplo de aproximadamente 5 a

5

aproximadamente 25% en peso, de un plastificante, preferiblemente un alcohol polihidroxilado tal como glicerol o sorbitol.

En ciertas realizaciones, las composiciones curativas para heridas de acuerdo con la presente invención pueden comprender también hasta aproximadamente 10% en peso, por ejemplo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5% en peso, típicamente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2% en peso de uno o más otros agentes terapéuticos para la curación de heridas, tales como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo, acetaminofén), esteroides, anestésicos locales, agentes antimicrobianos o factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos o factor de crecimiento derivado de plaquetas). El agente antimicrobiano puede comprender, por ejemplo, un antiséptico, un antibiótico o mezclas de los mismos. Los antibióticos preferidos incluyen tetraciclina, penicilinas, terramicinas, eritromicina, bacitracina, neomicina, polimicina B, mupirocina, clindamicina y mezclas de los mismos. Los antisépticos preferidos incluyen plata, incluyendo plata coloidal, sales de plata incluyendo sales de uno o más de los polímeros aniónicos que componen el material, sulfadiazina de plata, clorhexidina, povidona yodina, triclosán, sucralfato, sales de amonio cuaternario y mezclas de los mismos. El agente antimicrobiano preferido es la plata. Preferiblemente, la cantidad de plata (como iones de plata y plata metálica) en los materiales de acuerdo con la presente invención es de aproximadamente 0,01% en peso a aproximadamente 2% en peso, más preferiblemente de aproximadamente 0,05% en peso a aproximadamente 0,5% en peso, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,1% en peso a aproximadamente 0,3% en peso. Menores cantidades de plata podrían dar un efecto antimicrobiano insuficiente. Mayores cantidades de plata podrían dar lugar a efectos antiproliferativos sobre las células de curación de heridas.

10

15

20

Todos los porcentajes anteriores son sobre una base de peso en seco.

25

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un apósito para heridas que comprende una composición de apósito para heridas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.

30

La composición de apósito para heridas de acuerdo con la presente invención, como se define en la reivindicación 1, está típicamente en forma de lámina o capa, por ejemplo con un área de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> a aproximadamente 400 cm<sup>2</sup>, en particular de aproximadamente 2 cm<sup>2</sup> a aproximadamente 100 cm<sup>2</sup>. El peso base de la lámina es típicamente desde aproximadamente 100 g/m<sup>2</sup> hasta aproximadamente 5000 g/m<sup>2</sup>, por ejemplo desde aproximadamente 400 g/m<sup>2</sup> hasta aproximadamente 2000 g/m<sup>2</sup>. La lámina de la composición de acuerdo con la presente invención forma una capa activa del apósito.

35

Dicha capa activa en los apósitos de acuerdo con la invención sería normalmente la capa en contacto con la herida en uso, pero en algunas realizaciones podría separarse de la herida por una lámina superior permeable a los líquidos. Preferiblemente, el área de la capa activa tiene de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> a aproximadamente 400 cm<sup>2</sup>, más preferiblemente de aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> a aproximadamente 100 cm<sup>2</sup>.

40

El apósito para heridas puede consistir esencialmente en la capa activa de la composición de acuerdo con la presente invención, en cuyo caso el apósito se usaría normalmente conjuntamente con un apósito secundario adecuado. En otras realizaciones, el apósito para heridas de acuerdo con la invención comprende además una lámina de soporte que se extiende sobre la capa activa opuesta al lado enfrentado a la herida de la capa activa. Preferiblemente, la lámina de soporte es más grande que la capa activa de tal manera que una región marginal de anchura de 1 mm a 50 mm, preferiblemente de 5 mm a 20 mm, se extiende alrededor de la capa activa para formar un denominado apósito de isla. En tales casos, la lámina de soporte se recubre preferiblemente con un adhesivo de grado médico sensible a la presión en al menos su región marginal.

45

Preferiblemente, la lámina de soporte es sustancialmente impermeable a los líquidos. La lámina de soporte es preferiblemente semipermeable. Es decir, la lámina de soporte es preferiblemente permeable al vapor de agua, pero no permeable al agua líquida o al exudado de la herida. Preferentemente, la lámina de soporte es también impermeable a los microorganismos.

50

Los polímeros adecuados para formar la lámina de soporte incluyen poliuretanos y acrilatos y metacrilatos de polialcoxilquilo, tales como los descritos en el documento GB-A-1280631. Preferiblemente, la lámina de soporte comprende una capa continua de una espuma de poliuretano bloqueada de alta densidad que es predominantemente de celdas cerradas. Un material de lámina de soporte adecuado es la película de poliuretano disponible bajo la marca registrada ESTANE 5714F.

55

La capa adhesiva (cuando está presente) debe ser transmisora del vapor de la humedad y/o modelada para permitir el paso del vapor de agua a través de la misma. La capa adhesiva es preferiblemente una capa adhesiva sensible a la presión que transmite el vapor de la humedad del tipo utilizado convencionalmente para apósitos para heridas tipo isla. Se prefieren adhesivos sensibles a la presión basados en poliuretano.

El apósito para heridas de acuerdo con la presente invención puede comprender además una capa absorbente entre la capa activa y la lámina de soporte, especialmente si el apósito es para su uso en heridas exudantes. La capa absorbente opcional puede ser cualquiera de las capas utilizadas convencionalmente para absorber fluidos de heridas, suero o sangre en la técnica de curación de heridas, incluyendo gasas, telas no tejidas, superabsorbentes, hidrogeles y mezclas de los mismos.

Una lámina de cubierta extraíble puede proteger la superficie del apósito que se enfrenta a la herida. La lámina de cubierta está normalmente formada de un material termoplástico flexible. Los materiales adecuados incluyen poliésteres y poliolefinas. Preferiblemente, la superficie que mira hacia el adhesivo de la hoja de cubierta es una superficie de liberación. Es decir, una superficie que es sólo débilmente adherente a la capa activa y el adhesivo sobre la lámina de soporte para ayudar a retirar la lámina de cubierta. Por ejemplo, la hoja de cubierta puede estar formada a partir de un plástico no adherente tal como un fluoropolímero, o puede estar provista de un revestimiento de liberación tal como un recubrimiento de liberación de silicona o fluoropolímero.

Preferiblemente, el apósito para heridas de la presente invención es estéril y se envasa en un recipiente impermeable a los microorganismos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para la producción de una composición de apósito para heridas que comprende las etapas de: lisar macrófagos para formar un lisado y dispersar el lisado de células enteras, o una fracción de gránulos obtenida sometiendo el lisado de células enteras a centrifugación, o una fracción del sobrenadante obtenida sometiendo el lisado de células enteras a centrifugación en o sobre un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la composición de apósito para heridas que se puede obtener mediante el procedimiento de la invención es una composición de apósito para heridas de acuerdo con la presente invención como se ha definido anteriormente.

En ciertas realizaciones, la concentración de inhibidores de proteasa en las células del lisado de células enteras no viable se eleva sobre el nivel basal antes del paso de la lisis. Esto se logra cultivando los macrófagos en presencia de un agente seleccionado del grupo que consiste en citoquinas, endotoxinas bacterianas y exotoxinas, y mezclas de las mismas. Una toxina bacteriana adecuada para este propósito es un lipopolisacárido derivado de E. Coli.

En ciertas realizaciones, el lisado de células enteras se liofiliza antes de la etapa de la dispersión. La etapa de la dispersión puede llevarse a cabo mezclando o recubriendo el material de sustrato con el lisado de células enteras. En ciertas realizaciones, el lisado se mezcla con una dispersión acuosa que contiene componentes del sustrato sólido, y la mezcla entonces se liofiliza o se seca con disolvente para formar una esponja que contiene el lisado.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un lisado de células enteras no viable derivado de macrófagos, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una herida. Adecuadamente, el medicamento es una composición de apósito para heridas o un apósito para heridas como se ha definido anteriormente.

Convenientemente, la herida es una herida crónica. Se espera que las composiciones de la invención sean especialmente útiles para el tratamiento de heridas crónicas porque se sabe que las heridas crónicas exhiben niveles elevados de proteasas endógenas, lo que contribuye a una curación retardada de estas heridas. Ejemplos de heridas crónicas incluyen úlceras venosas, úlceras de decubitis y úlceras diabéticas.

También se describe un método de tratamiento de una herida en un mamífero, que comprende la etapa de aplicar a la herida una composición de apósito para heridas de acuerdo con la invención. Convenientemente, la herida es una herida crónica tal como una úlcera de decubitis, una úlcera venosa o una úlcera diabética.

Preferiblemente, el apósito se aplica a la herida crónica durante un período de al menos 1 hora, más preferiblemente al menos 6 horas, y lo más preferiblemente al menos 12 horas. El tratamiento puede prolongarse durante varios días o semanas, con cambios de apósito, según sea apropiado.

Se apreciará que las características o realizaciones alternativas o preferidas que se describen anteriormente en relación con cualquier aspecto de la invención también pueden ser aplicables en cualquier otro aspecto de la invención.

A continuación se describirán con más detalle diversos aspectos y realizaciones de la presente invención a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 muestra el porcentaje de estimulación celular de células dérmicas humanas normales (fibroblastos) cuando se incuban en presencia del fluido crónico de una herida (muestras (a) y (b)) o fluido agudo de herida (muestra (c));

La figura 2, que es para fines ilustrativos, muestra el porcentaje de proliferación de fibroblastos en cultivos de células dérmicas incubadas como sigue (a) suero al 10% como control positivo que estimula las células; (b) medio libre de suero como control negativo que mantiene las células pero no da crecimiento; (c) fluido crónico de la herida solo; (d)

medio (solución) en el que se preparó el liberado; (e) tanto el fluido de herida crónica como un liberado de células monocíticas; y (f) tanto el fluido crónico de la herida como el liberado de macrófagos; y

La figura 3 muestra el porcentaje de proliferación de fibroblastos en cultivos de células dérmicas incubadas como sigue (a) 10% de suero como un control positivo que estimula las células; (b) medio libre de suero como control negativo que mantiene las células pero no da crecimiento; (c) fluido crónico de la herida solo; y (d) el fluido de herida crónica y un lisado de macrófagos.

#### Ejemplo 1 y Ejemplo 2

Las liberaciones de macrófagos y los lisados se prepararon como sigue.

Las células de monocitos/macrófagos (células THP-1) obtenidas de una fuente comercial se cultivaron y mantuvieron en medio de cultivo celular (RPMI 1640 + 2 mM de glutamina que contenía 10% de FCS/FBS y 1% de antibiótico/antimicótico). Estas células se cultivan en suspensión y, por lo tanto, se subcultivan rutinariamente y se usan para pruebas experimentales a una densidad celular de  $2$  a  $9 \times 10^5$  células/ml. Las células se recogieron después por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. El sedimento se vuelve a suspender en medio RPMI que contiene PMA (éster de forbol - 12-miristato 13-acetato de forbol) para dar una concentración final de  $2,5 \times 10^{-7}$  M. Esto permite que las células se hagan adherentes y diferenciadas, es decir, se vuelvan macrófagos. La suspensión de células que contenía PMA se utilizó entonces para sembrar tres placas de microtitulación de 24 pocillos a una densidad celular de  $8 \times 10^6$  células/ml (es decir, 1 ml de suspensión celular se añadió a cada pocillo). Las placas se incubaron entonces a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas para permitir la adherencia de las células al plástico del cultivo del tejido.

El medio se reemplazó entonces por RPMI + lipopolisacárido (derivado de E. Coli, a 10 ng/ml) o por RPMI solo, y se dejó crecer durante 24 horas en un incubador humidificado a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. El lipopolisacárido añadido estimula la producción de las citoquinas deseadas, factores de crecimiento, proteasas e inhibidores de proteasa por las células. El medio condicionado se retiró entonces y se marcó el liberado de células de macrófagos. La monocapa de células restantes se recogió y se suspendió a una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células/ml, después de lo cual se sometieron a 3 ciclos de congelación-descongelación para preparar un lisado de macrófagos.

#### Ejemplo 3

Los liberados de monocitos se prepararon como sigue.

Se cultivaron células de monocitos/macrófagos (células THP-1) obtenidas de una fuente comercial y se mantuvieron en medio de cultivo celular (RPMI 1640 + 2 mM de glutamina que contenía 10% de FCS/FBS y 1% de antibiótico/antimicótico). Estas células se cultivan en suspensión y, por lo tanto, se subcultivan rutinariamente y se usan para ensayos experimentales a una densidad celular de  $2$ - $9 \times 10^5$  células/ml. Las células se recogieron después por centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos. A continuación, el sedimento se vuelve a suspender en medio RPMI y se vuelve a dividir en partes alícuotas a una densidad celular de  $8 \times 10^6$  células/ml (es decir, se añadió 1 ml de suspensión celular a cada tubo). La toxina lipopolisacárida derivada de E. Coli se añadió a algunos tubos (a 10 ng/ml en el medio RPMI) mientras que otros se dejaron con medio RPMI solo; en todos los casos las células se incubaron entonces a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. El medio acondicionado se eliminó luego y se marcó el liberado de células monocíticas.

#### Procedimiento 1

Los efectos esperados de los lisados y liberados celulares en la curación de heridas se estudiaron in vitro como sigue.

La incubación de células dérmicas humanas normales (fibroblastos) con exudado crónico de herida (fluido) proporciona un modelo para heridas crónicas. Se evaluó la capacidad del liberado de células o lisado para superar el efecto negativo del entorno de la herida crónica y estimular el crecimiento celular para determinar si el liberado de células o el lisado era capaz de estimular la curación en una herida crónica.

Se cultivaron fibroblastos dérmicos humanos adultos aislados de un donante macho (ATCC CRL-2068) y se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10% (v/v). Estas células fueron subcultivadas de forma rutinaria y se usaron para pruebas experimentales cuando el 95% eran confluentes. Los fibroblastos dérmicos humanos adultos se recogieron entonces y se volvieron a sembrar en DMEM + FBS al 10% a una densidad celular de  $4 \times 10^5$  células/ml en una placa de microtitulación de 96 pocillos (100 µl/pocillo). Las células se dejaron adherirse y extenderse a la superficie del pocillo durante 24 horas en una incubadora humidificada a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. El medio se eliminó luego por aspiración y la monocapa celular se lavó con DMEM exento de suero. A continuación, se añadieron muestras de ensayo a la monocapa celular (100 µl/pocillo), con al menos 3 repeticiones de cada material ensayado. Todas las muestras de ensayo se incubaron con las células durante 72 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este periodo de incubación, se añadió una solución de marcaje a partir de un equipo de proliferación celular comercial (XTT, Cell Proliferation kit II, Cat. N° 1 465 015, obtenido de Boehringer Mannheim). Se obtuvo una lectura de absorbancia inicial a 450 nm, y se tomó una lectura

final a las 2,5 h, se incubó la placa de microtitulación a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante este tiempo. El efecto proliferativo de cada condición de ensayo se evaluó comparando las lecturas de absorbancia medidas. Utilizando los valores de control positivo (10% FBS/DMEM) y negativo (DMEM libre de suero) como 100% y 0% respectivamente, todas las otras condiciones se pudieron calcular como % de proliferación.

- 5 Las muestras de ensayo incluyeron fluido de la herida agudo y crónico, obtenido de pacientes con una herida del sitio del donante o una úlcera venosa crónica, respectivamente. El líquido de la herida se recogió por aspiración en ambos casos.

Se realizaron experimentos adicionales sobre un fluido de herida simulado, que representa las condiciones hostiles de una herida crónica. El fluido de la herida simulado comprendía PBS + 2% de BSA + elastasa (5 µg/ml).

- 10 Todos los fluidos de la herida se diluyeron 1:2 con muestras de ensayo apropiadas, es decir liberados de macrófagos, lisado de macrófagos, liberado de monocitos y se incubaron durante 2 horas a 37°C antes de la adición a los fibroblastos. En este punto, las muestras de ensayo se diluyeron adicionalmente a 1:2 con DMEM libre de suero y se añadieron directamente a la monocapa de células para su evaluación en el ensayo de proliferación celular como se ha descrito anteriormente.

- 15 Haciendo referencia a la FIG. 1, se puede observar que la proliferación de fibroblastos para las muestras de células dérmicas (a) y (b) cultivadas en el fluido crónico de la herida era mucho menor, de hecho negativa, en comparación con las células (c) cultivadas en el fluido agudo de la herida. Se cree que esto se debe a la presencia de altos niveles de enzimas proteasas en el fluido crónico de la herida que degradan los factores de crecimiento e interfieren de otro modo con la proliferación celular.

- 20 Haciendo referencia a la FIG. 2, que tiene fines ilustrativos, las células dérmicas se incubaron en (a) 10% de suero como un control positivo que estimula las células; (b) medio libre de suero como control negativo que mantiene las células pero no da crecimiento; (c) fluido crónico de la herida solo; (d) el medio en el que se preparó el liberado; (e) tanto el fluido crónico de herida como un liberado de células monocíticas; y (f) tanto el fluido crónico de la herida como el liberado de macrófagos.

- 25 Los resultados muestran que el liberado de macrófagos estimula significativamente el crecimiento celular y puede revertir el efecto negativo del entorno de la herida crónica. Este efecto es significativamente mejor que el efecto observado con el liberado de monocitos.

- Haciendo referencia a la FIG. 3, las muestras son (a) 10% de suero como un control positivo que estimula las células; (b) medio libre de suero como control negativo que mantiene las células pero no da crecimiento; (c) fluido crónico de la herida solo; y (d) el fluido crónico de herida y un lisado de macrófagos. Se puede observar que la muestra del lisado de macrófagos (d) también fue capaz de superar el efecto negativo del entorno de herida crónica y estimular el crecimiento celular.
- 30

Un efecto similar se lograría con hepatocitos. Esto se debe a que los macrófagos y los hepatocitos producen una combinación de factores de crecimiento e inhibidores de proteasa, principalmente alfa-1-antitripsina.

- 35 Las realizaciones anteriores se han descrito únicamente a modo de ejemplo. Muchas otras realizaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas serán evidentes para el lector experto.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición de apósito para heridas que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un lisado de células enteras no viable, o una fracción de sedimento obtenida sometiendo el lisado de células enteras a centrifugación, o una fracción del sobrenadante obtenida sometiendo el lisado de células enteras a centrifugación; siendo el lisado de células enteras derivado de macrófagos, en el que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable está en forma de una hoja sólida, un ungüento semisólido, una hoja sólida con aberturas, una banda, una tela tejida, una tela de punto, una tela no tejida, una espuma hidrófila, una esponja liofilizada o una esponja secada con disolvente.
- 10 2. Una composición de apósito para heridas según la reivindicación 1, en la que el lisado de células enteras, la fracción de sedimento del lisado de células enteras o la fracción del sobrenadante del lisado de células enteras se dispersa en o sobre un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. Una composición de apósito para heridas de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable comprende una esponja bioabsorbible liofilizada.
- 20 4. Una composición de apósito para heridas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el lisado de células enteras o la fracción de sedimento del lisado de células enteras o la fracción de sobrenadante del lisado de células enteras se dispersa en o sobre un vehículo sólido que comprende, o consiste esencialmente en, un material bioabsorbible sólido seleccionado del grupo que consiste en colágeno, quitosano, celulosa oxidada, o mezclas de los mismos.
- 25 5. Una composición de apósito para heridas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está sustancialmente seca.
- 30 6. Una composición de apósito para heridas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la composición comprende además de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10% en peso, sobre una base en peso seco, de una o más sustancias terapéuticas para curar heridas.
- 35 7. Una composición de apósito para heridas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es sustancialmente estéril.
- 40 8. Un apósito para heridas que comprende una composición de apósito para heridas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
- 45 9. Un apósito para heridas según la reivindicación 8, que es estéril y que está envasado en un recipiente impermeable a los microorganismos.
- 50 10. El uso de un lisado de células enteras no viable, o una fracción de granulado obtenida sometiendo el lisado de células enteras a centrifugación, o una fracción del sobrenadante obtenida sometiendo el lisado de células enteras a centrifugación, derivándose el lisado de células enteras de macrófagos para la preparación de un medicamento para el tratamiento de heridas.
- 55 11. El uso según la reivindicación 10, en el que la herida es una herida crónica.
- 60 12. El uso según la reivindicación 11, en el que dicha herida crónica se selecciona del grupo que consiste en úlceras venosas, úlceras de decubitis y úlceras diabéticas.
- 65 13. Un procedimiento para la producción de un apósito para heridas que comprende las etapas de: lisar los macrófagos para formar un lisado, y dispersar el lisado de células enteras, o una fracción del granulado obtenida sometiendo el lisado de células enteras a centrifugación, o una fracción del sobrenadante obtenida sometiendo el lisado de células enteras a centrifugación en o sobre un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 70 14. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además la etapa, antes de dicha etapa de lisis, de cultivar los macrófagos en presencia de un agente seleccionado del grupo que consiste en citoquinas, endotoxinas bacterianas y exotoxinas y mezclas de las mismas.
- 75 15. Un procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, que comprende además la etapa de liofilizar dicho lisado antes de dicha etapa de dispersión.

**FIG. 1**

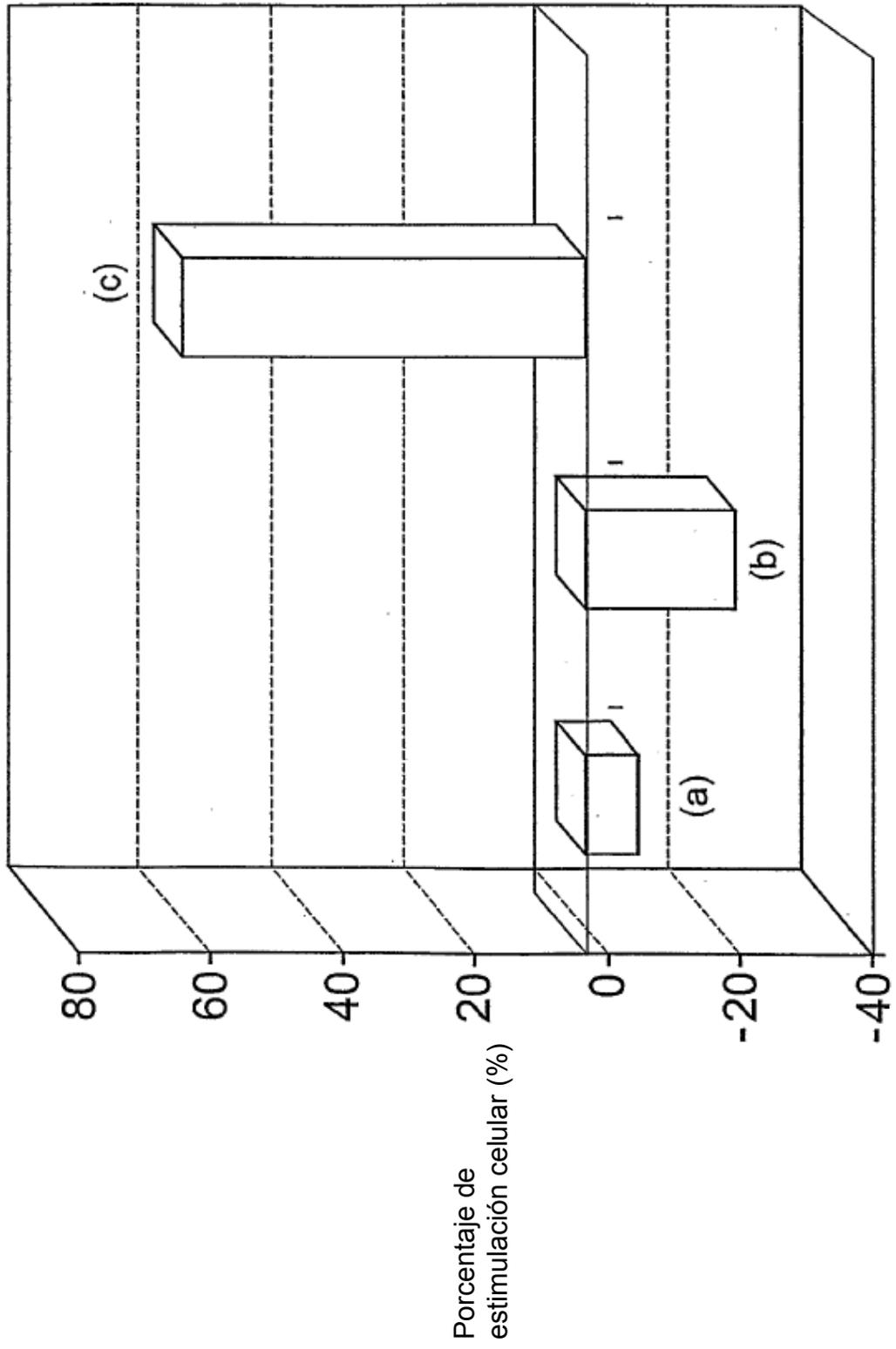
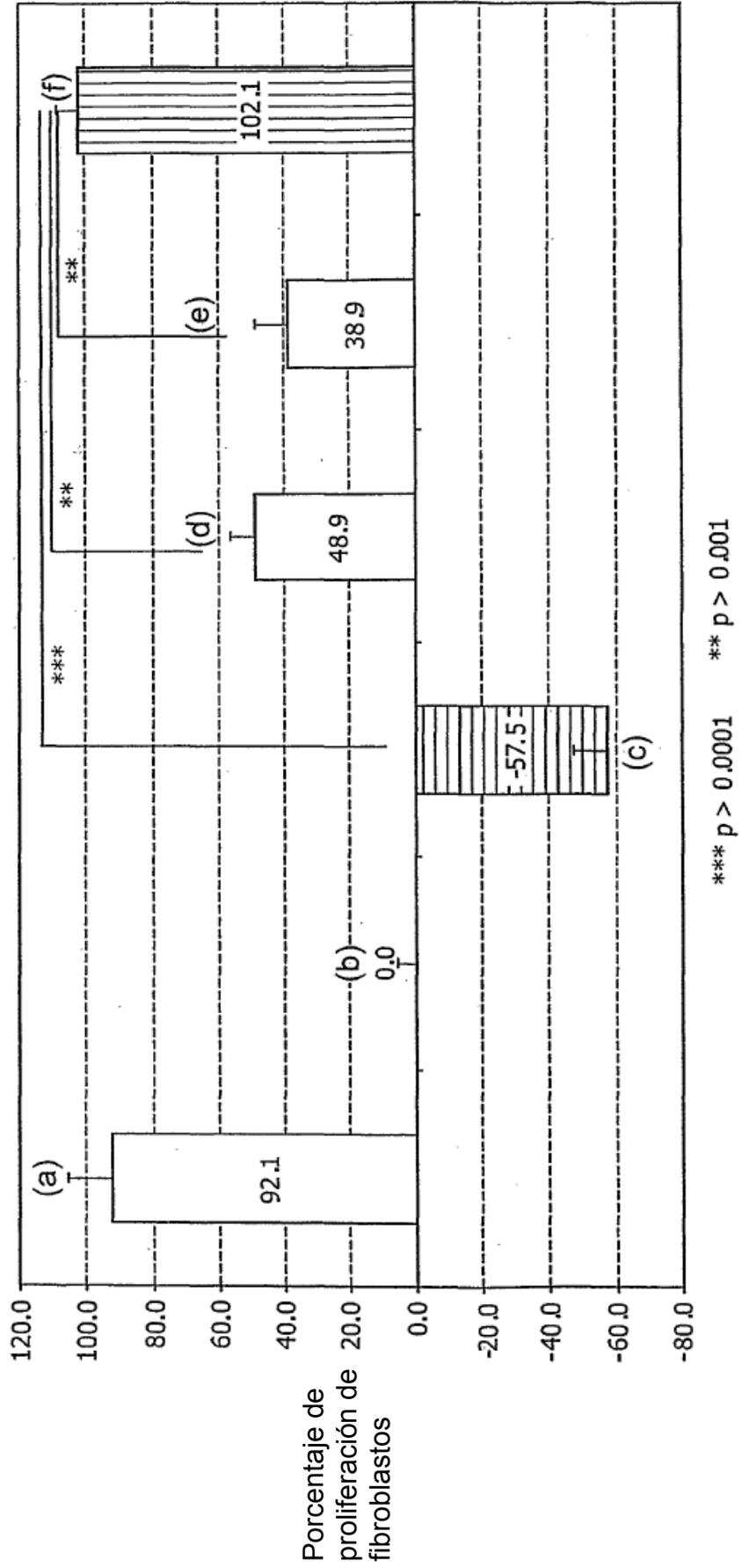


FIG. 2



**FIG. 3**

