

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 113**

51 Int. Cl.:

A61L 27/60 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2006 PCT/US2006/040608**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2007 WO07047707**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2006 E 06817074 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 1945757**

54 Título: **Método de suministro de células progenitoras del folículo piloso a la piel**

30 Prioridad:

17.10.2005 US 727588 P

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

16.02.2018

73 Titular/es:

**ADERANS RESEARCH INSTITUTE, INC. (100.0%)
9100 Wilshire Blvd., East Tower Penthouse
Beverly Hills, CA 90212, US**

72 Inventor/es:

**ZHENG, YING;
DU, XIAOBING;
WASHENIK, KENNETH, JUSTIN y
STENN, KURT, STRICKER**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 655 113 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

Método de suministro de células progenitoras del folículo piloso a la piel

5 Antecedentes de la invención

El desarrollo de técnicas apropiadas de suministro de células es importante para muchas aplicaciones. No solo deben las células suministrarse a la parte apropiada del sujeto, sino que la morfología de las células debe mantenerse. La morfología de las células puede ser importante en muchos contextos. La morfología celular indica el estado de la célula, tanto en términos de la salud de las células como en términos del estado de diferenciación de la célula. Los cambios de la forma celular, o morfogénesis, es importante para la función, desarrollo y patología celulares. En las células los procesos fisiológicos a menudo están acompañados de cambios en la morfología celular. Los ejemplos incluyen cambios en el emplazamiento intracelular, la disposición y la estructura de los constituyentes celulares, tales como los orgánulos, los agregados macromoleculares o el citoesqueleto, los cambios en la morfología de toda la célula, tales como su forma y superficie, los cambios en la separación y la proximidad entre células, y las propiedades de las colonias multicelulares tales como su forma, tamaño y emplazamientos celulares.

20 Sumario de la invención

La presente invención se refiere al uso de células formadoras de piel para la fabricación de un medicamento y de células formadoras de piel para su uso en un método de tratamiento, reparación o mejora de una afección seleccionada del grupo que consiste en úlceras de la piel, úlceras de pie diabético, escaras de decúbito, heridas por quemaduras, infecciones microbianas y cicatrices, donde el método comprende hacer una herida en la piel con un instrumento punzocortante de forma que la herida sea lo suficientemente superficial como para que el sujeto no sangre; y colocar las células formadoras de piel sobre la herida, donde se forma nueva piel.

La invención se divulga en las reivindicaciones.

30 Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra una rejilla de cortes superficiales en la superficie de la piel de un ratón desnudo y excrecencia pilosa (recuadro) observado a las dos semanas posadministración de células de piel de ratón negro recién nacido.

La FIG. 2 muestra una hoja de bisturí utilizada para hacer una herida punzante superficial en la superficie de la piel de un ratón desnudo y la excrecencia pilosa (recuadro) observado a las dos semanas posadministración de células de piel de ratón negro recién nacido en la herida.

40 Descripción detallada de la invención

Se ha descubierto que las células pueden suministrarse en la piel superficial sin alterar las características inherentes de las células al hacer una herida en un área en donde se desean las células y colocar las células sobre la herida. Se espera que las células se orienten por sí mismas de forma apropiada para formar la estructura deseada tras el suministro con el método de la presente invención. Convenientemente, las células pueden colocarse sobre la superficie de la piel sobre la parte superior de la herida o en la propia herida.

El método de suministro de células de la presente divulgación puede utilizarse para formar tallos de pelo que salen. El método de suministro de células también puede utilizarse para formar nueva piel para tratar, reparar o mejorar afecciones que incluyen, pero sin limitación, úlceras de la piel, úlceras del pie diabético, escaras de decúbito, heridas por quemaduras, infecciones microbianas y cicatrices tales como las que son el resultado de cirugías, acné o enfermedades tales como la varicela. El suministro de células apropiadas mediante los métodos de la presente divulgación también podría utilizarse para formar glándulas sudoríparas, uñas, cejas, pestañas y otros pelos. El método de la presente divulgación también podría utilizarse para formar la dermis o epidermis utilizando células autólogas o alogénicas genéticamente modificadas. Convenientemente, el método de suministro de células puede utilizarse para formar tanto la capa dérmica como la epidérmica de la piel. Como alternativa, las capas dérmica o epidérmica pueden formarse mediante el método divulgado.

La herida puede formarse mediante cualquier técnica que rompa la superficie externa del área donde se desean las células, tal como punzando, cortando o arañando el área con un instrumento punzocortante, incluyendo, pero sin limitación, una hoja de bisturí o una aguja. La herida también puede formarse erosionando el área con, por ejemplo, agujas hipodérmicas tales como microagujas o agujas acanaladas.

Para determinadas realizaciones, el instrumento punzocortante puede modificarse para formar una herida con una profundidad medida. Por ejemplo, la herida puede ser al menos aproximadamente de 10 μm de profundidad, al menos aproximadamente 200 μm de profundidad, no más de aproximadamente 500 μm de profundidad o no más de

aproximadamente 250 μm de profundidad. La herida puede ser de aproximadamente 10 μm a aproximadamente 500 μm de profundidad. La herida puede tener una longitud máxima ilimitada. En determinadas realizaciones de la invención, la profundidad de la herida puede ajustarse para suministrar las células en la subepidermis, la dermis papilar, la dermis reticular superior o en los mismos niveles del lecho ungueal de la piel de las partes acras (piel palmar-plantar). La herida es lo suficientemente superficial como para que el sujeto no sangre. La herida se cura adecuadamente sin formar una cicatriz.

Después de colocar las células sobre la herida, la herida puede cubrirse con un vendaje o apósito; por ejemplo, un apósito no adherente o un apósito plástico transparente tal como Tegaderm® (3M, St. Paul, MN) o un apósito para quemaduras a base de gel. También puede aplicarse a la herida vaselina o similares. El apósito puede dejarse en su lugar durante aproximadamente 3 a aproximadamente 7 días. Convenientemente, el apósito puede ser sustancialmente impermeable al agua.

Las células pueden comprender células dérmicas, células epidérmicas, células madre epidérmicas, células basales, queratinocitos, fibroblastos o combinaciones de los mismos. Las células pueden obtenerse de fuentes foliculares, ecrinas o ungueales. Convenientemente, las células son células formadoras de piel o células progenitoras del folículo piloso. Para determinadas realizaciones de la presente invención, la proporción de células epidérmicas con respecto a las dérmicas es, convenientemente, aproximadamente de 10:1 a aproximadamente 1:10. Convenientemente, la proporción puede ser de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1.

Las células pueden, convenientemente, proporcionarse en una suspensión en un vehículo fisiológicamente aceptable, por ejemplo, solución salina estéril. También pueden añadirse a la suspensión celular componentes adicionales. Los componentes adicionales adecuados incluyen factores de crecimiento, moléculas nutritivas o moléculas estabilizantes.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a una mayor comprensión de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Excrecencia pilosa a partir de células inductoras de folículo administradas a cortes superficiales en la superficie de la piel de ratón (no de acuerdo con la invención).

Se anestesió un ratón atímico desnudo (*nu/nu*) (Charles River, Inc.) y se hicieron cortes superficiales en forma de cuadrícula (Figura 1) en la piel dorsal con el uso de una hoja de bisturí número 11. Los cortes fueron lo suficientemente superficiales como para no extraer sangre. Se preparó como sigue una mezcla de células de piel de ratón negro recién nacido aisladas recientemente que comprendía 100.000 células epidérmicas y 200.000 células dérmicas. Se retiró piel troncal de ratones recién nacidos y se lavó en PBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} . La piel se extendió plana en PBS que contenía dispasa (2,5 mg por ml, Invitrogen, Carlsbad, CA) a 4 °C durante una noche o a 37 °C durante 2 horas. Las células dérmicas y epidérmicas inductivas se aislaron como se describe en Weinberg *et al.*, J. Invest. Dermatol., 100: 229-236 (1993). Mediante una pipeta se suministró a la cuadrícula de cortes una suspensión de las células en 2 microlitros de solución salina tamponada estéril. La piel se separó cuidadosamente durante unos pocos segundos para permitir que el fluido se extienda por toda la rejilla. Se aplicó a la herida un apósito no adherente, hidrófobo (gasa recubierta de vaselina) y se vendó adicionalmente al ratón con una envoltura elástica para impedir el desprendimiento del vendaje tras la recuperación de la anestesia. El apósito se retiró tras 10 días. Tras 2 semanas, se observó el crecimiento de pelo (Figura 1, recuadro) principalmente dentro del patrón de la cuadrícula. Después, se sacrificó al ratón y se retiró la piel cuidadosamente. La observación de la parte inferior de la piel reveló que casi no había pelos encarnados y la presencia de bulbos foliculares que correspondían al pelo visible observado en la superficie de la piel.

Ejemplo 2. Excrecencia pilosa de células inductoras de folículo administradas a la herida punzante superficial en la superficie de la piel del ratón (no de acuerdo con la invención).

Se anestesió un ratón atímico desnudo (*nu/nu*) (Charles River, Inc.) y se hizo una herida punzante en la piel perforando con la punta de una hoja de bisturí número 11 mantenida a un ángulo bajo con respecto a la superficie de la piel (Figura 2). Se preparó como se describe anteriormente una mezcla de células de piel de ratón negro recién nacido aisladas recientemente que comprendía 100.000 células epidérmicas y 200.000 células dérmicas. Mediante una pipeta se instiló en el corte una suspensión de las células en 2 microlitros de solución salina tamponada estéril. Se aplicó a la herida un apósito no adherente, hidrófobo (gasa recubierta de vaselina) y se vendó adicionalmente al ratón con una envoltura elástica para impedir el desprendimiento del apósito tras la recuperación de la anestesia. El apósito se retiró tras 10 días. Tras 2 semanas, se observó el crecimiento del pelo (Figura 2, recuadro) precisamente en el sitio de la incisión punzante. Después, se sacrificó el ratón y se retiró la piel cuidadosamente. La observación de la parte inferior de la piel reveló que casi no había pelos encarnados y la presencia de bulbos pilosos que correspondían con el pelo visible observado sobre la superficie celular.

Ejemplo 3. Uso de distintos apósitos para heridas (no de acuerdo con la invención).

Los Ejemplos 1 y 2 se repitieron utilizando distintos tipos de apósito para heridas, como se muestra en la Tabla 1.

5

TABLA 1

Suministro superficial de células de ratón en Ratones Desnudos					
Método de suministro	Tipo de apósito	N.º de células suministradas de piel de ratón negro recién nacido	Vol. (μ l)	Número de repeticiones	Tasa de excrecencias
Ejemplo 1	Ninguno	1×10^5 epidérmicas mezcladas con 2×10^5 dérmicas	2	8	0
Ejemplo 1	No adherente	1×10^5 epidérmicas mezcladas con 2×10^5 dérmicas	2	6	6
Ejemplo 1	Parche para quemaduras	1×10^5 epidérmicas mezcladas con 2×10^5 dérmicas	2	4	3
Ejemplo 1	Tegaderm™	1×10^5 epidérmicas mezcladas con 2×10^5 dérmicas	2	5	2
Ejemplo 2	Ninguno	1×10^5 epidérmicas mezcladas con 2×10^5 dérmicas	2	12	5
Ejemplo 2	No adherente	1×10^5 epidérmicas mezcladas con 2×10^5 dérmicas	2	16	9
Ejemplo 2	Parche para quemaduras	1×10^5 epidérmicas mezcladas con 2×10^5 dérmicas	2	5	5
Ejemplo 2	Tegaderm™	1×10^5 epidérmicas mezcladas con 2×10^5 dérmicas	2	5	2

Ejemplo 4. Nuevo crecimiento de pelo en cuero cabelludo calvo mediante la aplicación de células autólogas en incisiones superficiales (no de acuerdo con la invención).

10 Se crean heridas superficiales en la cabeza de un sujeto humano con una cuchilla quirúrgica o bisturí, como cuadrículas, múltiples cruces, líneas paralelas y patrones de tipo similar para conseguir el efecto estético deseado para el crecimiento del pelo. Después, se extienden sobre la parte superior de los cortes superficiales células dérmicas y epidérmicas tricogénicas autólogas humanas (mezcladas de forma opcional con melanocitos de folículo piloso, si es necesario para reestablecer la pigmentación del pelo) en suspensión, con puntas de pipeta o jeringas, y se cubre la herida durante 2-3 días para evitar que las células se sequen antes de incorporarse en la piel. Después se forman folículos pilosos que salen.

15 **Ejemplo 5.** Nuevo crecimiento de pelo en cuero cabelludo calvo mediante la aplicación de células dérmicas en incisiones superficiales (no de acuerdo con la invención).

20 Se crean heridas en la cabeza de un sujeto humano con una cuchilla quirúrgica o bisturí, como cuadrículas, múltiples cruces, líneas paralelas y patrones de tipo similar para conseguir el efecto estético deseado para el crecimiento del pelo. Después, se extienden sobre la parte superior de los cortes superficiales solo células dérmicas tricogénicas humanas (mezcladas de forma opcional con melanocitos de folículo piloso, si es necesario para reestablecer la pigmentación del pelo) en suspensión, con puntas de pipeta o jeringas, y se cubre la herida durante 2-3 días para evitar que las células se sequen antes de incorporarse en la piel. Después se forman folículos pilosos que salen.

25 **Ejemplo 6.** Formación de piel nueva para tratar un sujeto con una úlcera de pie diabético.

30 Se anestesia un sujeto con una úlcera de pie diabético con anestesia local o general, y se hacen una serie de cortes superficiales en la úlcera. Los cortes son lo suficientemente superficiales como para no extraer sangre. Mediante una pipeta se suministra a los cortes una suspensión de células basales en 2 microlitros de solución salina tamponada estéril. Se separa cuidadosamente la piel durante unos pocos segundos para permitir que el fluido se extienda por toda la cuadrícula. Se aplica a la herida un apósito no adherente, hidrófobo (venda recubierta de vaselina). El apósito se retira tras 10 días. Se forma piel nueva y la úlcera se cura.

35

Ejemplo 7. Formación de piel nueva para tratar un sujeto con escaras de decúbito.

5 Se anestesia un sujeto con escaras de decúbito con anestesia local o general, y se hacen una serie de cortes superficiales en la escara de decúbito. Los cortes son lo suficientemente superficiales como para no extraer sangre. Mediante una pipeta se suministra a los cortes una suspensión de células basales en 2 microlitros de solución salina tamponada estéril. La piel se retira cuidadosamente durante unos pocos segundos para permitir que el fluido se extienda por toda la cuadrícula. Se aplica a la herida un apósito no adherente, hidrófobo (gasa recubierta de vaselina). Tras 10 días se retira el apósito. Se forma piel nueva y la escara de decúbito se cura.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de células formadoras de piel para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, reparación o mejora de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en úlceras de la piel, úlceras de pie diabético, escaras de decúbito, heridas por quemaduras, infecciones microbianas y cicatrices,
- 10 donde el tratamiento, reparación o mejora de la afección comprende hacer una herida en la piel con un instrumento punzocortante de forma que la herida sea lo suficientemente superficial como para que el sujeto no sangre; y colocar las células formadoras de piel sobre la herida, donde se forma piel nueva.
- 15 2. El uso de la reivindicación 1, donde las células comprenden células basales.
3. El uso de la reivindicación 1, donde las células se colocan en la piel subepidérmica, o en la piel dérmica papilar, o en la piel dérmica reticular superior.
- 20 4. El uso de la reivindicación 1, donde la herida es al menos aproximadamente de 10 μm de profundidad, o al menos aproximadamente de 200 μm de profundidad, o no más de aproximadamente 500 μm de profundidad, o no más de aproximadamente 250 μm de profundidad.
- 25 5. Células formadoras de piel para su uso en un método de tratamiento, reparación o mejora de una afección seleccionada del grupo que consiste en úlceras de la piel, úlceras de pie diabético, escaras de decúbito, heridas por quemaduras, infecciones microbianas y cicatrices,
- donde el método comprende hacer una herida en la piel con un instrumento punzocortante de forma que la herida sea lo suficientemente superficial como para que el sujeto no sangre; y colocar las células formadoras de piel sobre la herida, donde se forma piel nueva.
- 30 6. Las células formadoras de piel para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde las células comprenden células basales.
7. Las células formadoras de piel para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde las células se colocan en la piel subepidérmica, o en la piel dérmica papilar, o en la piel dérmica reticular superior.
- 35 8. Las células formadoras de piel para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, donde la herida es al menos aproximadamente de 10 μm de profundidad, o al menos aproximadamente de 200 μm de profundidad, o no más de aproximadamente 500 μm de profundidad, o no más de aproximadamente 250 μm de profundidad.

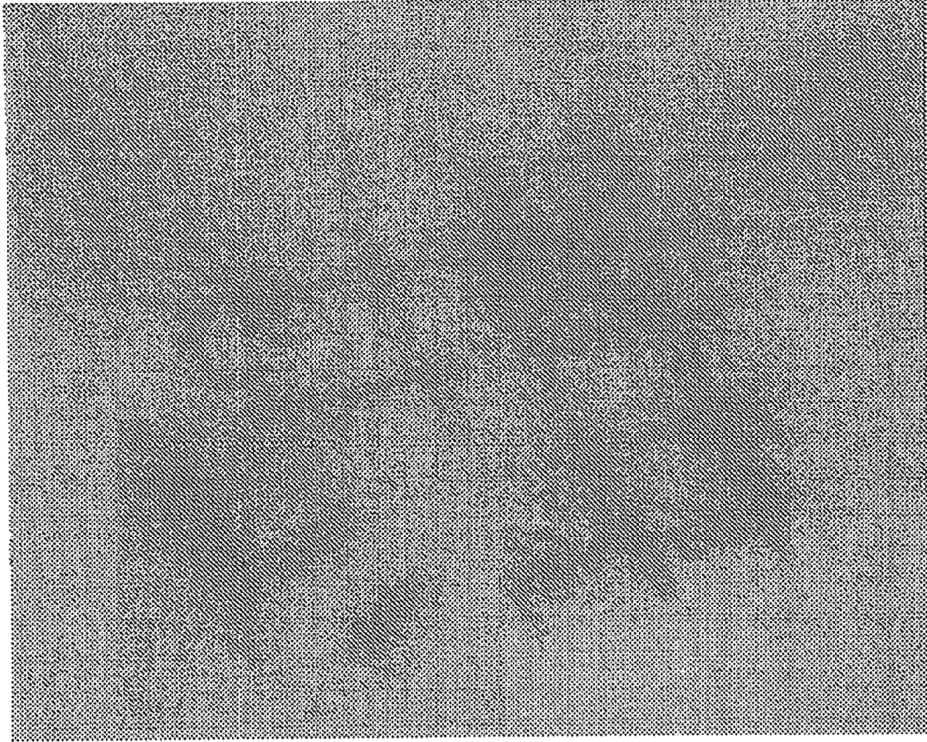


FIG. 1

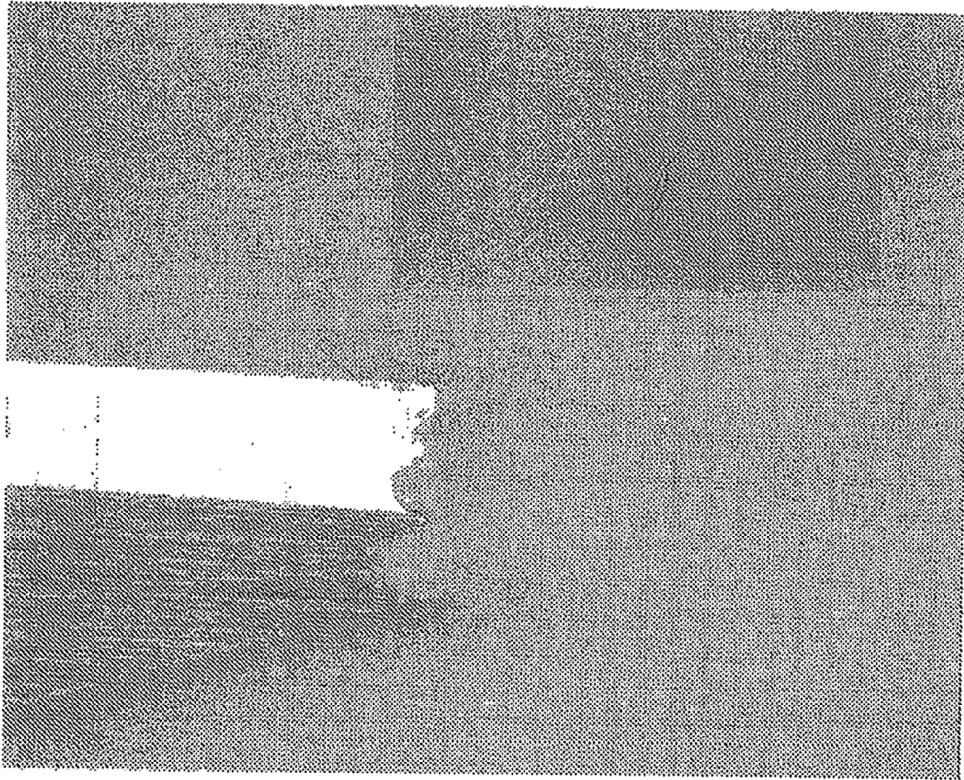


FIG. 2