

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 690**

51 Int. Cl.:

A61L 15/32 (2006.01)

A61L 15/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2007 PCT/IB2007/002264**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2008 WO08017927**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2007 E 07804721 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2049164**

54 Título: **Método para tratar heridas de piel**

30 Prioridad:

10.08.2006 US 836671 P

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

16.04.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES (33.3%)

12 RUE DE L'ECOLE DE MEDECINE

75270 PARIS CEDEX 06, FR;

INSERM (33.3%) y

ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS

(33.3%)

72 Inventor/es:

GOGLY, BRUNO;

COULOMB, BERNARD y

LAFONT, ANTOINE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 663 690 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 para tratar heridas de piel

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional anterior de EE. UU. 60/836.671 presentada el 10 de agosto de 2006.

5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con un método para tratar heridas de piel, en particular al promover o acelerar la curación de heridas de piel.

Antecedentes de la invención

10 La piel es un órgano grande, crucial para la vida, que protege al organismo contra tensiones ambientales, tales como esfuerzos físicos, químicos y mecánicos, y que impide pérdida de agua. La complejidad de la piel surge en particular de la asociación de diversos tejidos que tienen diferentes orígenes embriológicos. Si bien las funciones de barrera de la piel dependen de la epidermis, mediante el proceso de diferenciación de los queratinocitos, la homeostasis de la piel depende del equilibrio de múltiples interacciones celulares y tisulares en las que la dermis juega un papel clave.

15 Inmediatamente después de ocurrir una lesión de piel, tienen lugar varios acontecimientos para reparar el tejido dañado. La curación de heridas es un proceso complejo y dinámico que implica mediadores solubles, células sanguíneas, componentes de matriz extracelular, y células residentes, incluidos fibroblastos.

20 Brevemente, el proceso de curación de heridas incluye tres fases interactivas: inflamación, formación de tejido de granulación y remodelación. Esta secuencia de acontecimientos busca la recuperación de integridad de tejido y la restauración de sus funciones. La calidad de la curación - que idealmente debe llevar a una ausencia de cicatriz y al restablecimiento de la función tisular - es así dependiente de un complejo equilibrio.

En muchas especies, el feto posee la exclusiva capacidad de curar heridas de piel sin formación de cicatriz (Estes et al. (1994) Differentiation 56:173; Ferguson et al. (1996) Plast. Reconstr. Surg. 97:854), no obstante los adultos siempre presentarán secuelas que pueden llevar a trastornos funcionales.

25 En algunos casos, durante el proceso de curación de heridas ocurren problemas, que llevan a excesivo desarrollo de cicatriz consecutivo a una excesiva deposición de matriz extracelular (p. ej. cicatrices hipertróficas y queloides). En contraste, una perturbación en la curación de heridas también se puede caracterizar por una pobre curación o ausencia de curación, como se observa en particular en diabetes, y presión arterial o úlceras venosas.

30 Las características de cicatrices hipertróficas y contracción que siguen a heridas por quemaduras lleva a problemas funcionales. El tratamiento para tales heridas generalmente consiste en el uso de apósitos compresivos que tendrán que mantenerse durante meses o años. En la mayoría de casos serán necesarias operaciones quirúrgicas adicionales.

Además, excesiva cicatrización, mala curación o ausencia de curación, afectan a la calidad de vida de los pacientes, pero también representan un alto coste.

35 Actualmente se usan diversos tratamientos para tratar de reiniciar el proceso de curación de heridas en heridas crónicas, tales como el uso de detersión, de factores de crecimiento, o de terapia con vacío. Sin embargo, en muchos casos estos tratamientos han demostrado ser insatisfactorios.

Así, la mejora de la funcionalidad de área "curada" tras el cierre de herida es un primer objetivo en la gestión de heridas de piel. Además, otro objetivo es la promoción y la estimulación del proceso de curación de heridas en heridas crónicas.

40 Como tal, injerto de células o injerto de tejidos reconstruidos in vitro parecen ser un campo prometedor en el tratamiento de heridas de piel.

45 En el marco de curación de heridas de piel, el requisito mínimo es restablecer una función de barrera para evitar infección y pérdida de agua. Es la capa callosa de la epidermis (el producto de diferenciación queratinocito terminal) la que juega este papel. Sin embargo, aunque la función de barrera depende de la epidermis, también está la necesidad de mejorar el injerto incorporando tejido dérmico a fin de promover la funcionalidad de la zona injertada.

La formación de neodermis es una etapa importante en la curación de heridas dado que la dermis es el factor principal de varias de las propiedades mecánicas de la piel y promueve la formación y el anclaje de una neoepidermis, en particular a través de la activación de crecimiento y diferenciación de queratinocitos.

50 El injerto de fibroblasto dérmico en el marco de la gestión de heridas de piel ha demostrado acelerar la formación de una neodermis y mejora la funcionalidad del área injertada (Coulomb et al. (1998) Plast. Reconstr. Surg. 101:1891-1903). Esto es en particular debido a la promoción de la síntesis de elastina que contribuye a las propiedades

mecánicas de la piel. Esta mejora en la dermis impacta directamente en la organización y anclaje de la epidermis.

Así, en humanos, una unión dermoepidérmica normal no modulada se forma en menos de uno año de injerto de fibroblasto dérmico en una herida de piel mientras que en ausencia de injerto de este tipo, se requieren de 3 (en niños) a 5 años (en adultos) para obtener el mismo resultado.

- 5 Sin embargo, la calidad de curación de heridas, es decir, la desaparición de marcas de herida (cicatriz) y restablecimiento de las propiedades funcionales de la piel, es el resultado de un equilibrio delicado y la mayor parte del tiempo no se pueden impedir las consecuencias.

Adicionalmente, en situaciones tales como quemaduras grandes, los fibroblastos dérmicos no pueden estar disponibles en suficiente número.

- 10 Como tal, un objeto de la presente invención es proporcionar una alternativa ventajosa al uso de fibroblastos dérmicos en la gestión de heridas de piel.

- 15 Se han explorado otros fibroblastos para su implicación en curación de heridas. Sin embargo, se han encontrado menos eficientes que los fibroblastos dérmicos. Por ejemplo, fibroblastos del tejido adiposo aunque son similares a los fibroblastos dérmicos en muchos aspectos (van der Bogaerdt et al. (2002) Arch. Dermatol. Res. 294:135-142) han probado ser menos eficientes que el fibroblasto dérmico para promover el crecimiento y la diferenciación de queratinocitos para la formación de una epidermis (Middelkoop (2005) Int. J. Low Extreme Wounds 4:9-11). Además, el documento WO 98/22154 A describe espumas de biopolímero que pueden ser sembradas con fibroblastos dérmicos y queratinocitos, para reparar tejidos tales como la piel.

- 20 Los fibroblastos gingivales son células mesenquimales que pueden migrar, adherirse y proliferar dentro del tejido conjuntivo blando de la encía, manteniendo de ese modo la integridad del tejido gingival que se expone a numerosas agresiones, tales como esfuerzos mecánicos, infecciones bacterianas o variaciones de pH y temperatura. Fibroblastos gingivales se describen en particular en los documentos Clin. Oral Invest. 1:147-152 de Gogly et al., (1997); Biochem. Pharmacol. 56:1447-1454 de Gogly et al. (1998); y J. Periodontol. 74:188-195 de Ejeil et al. (2003).

- 25 Dependiendo de las condiciones ambientales, los fibroblastos gingivales pueden modular su fenotipo, y responder al proliferar, migrar, sintetizar componentes de matriz o enzimas relacionadas con la matriz. Los fibroblastos gingivales sintetizan colágenos (p. ej. tipos I, III, V, VI, VII, XII) fibras elásticas (oxitalán, elaunina y elastina), proteoglicanos y glicosaminoglicanos (p. ej. decorina, biglicán), glicoproteínas (p. ej. fibronectina, tenascina). Simultáneamente, los fibroblastos gingivales sintetizan enzimas que pueden degradar compuestos macromoleculares (metaloproteinasas de matriz; MMP), pero también enzimas que inhiben formas activas de las MMP (Inhibidores de metaloproteinasas; TIMP). Los fibroblastos gingivales son así actores importantes de la remodelación de matriz extracelular.

30 **Compendio de la invención**

La presente invención surge del hallazgo inesperado por parte de los presentes inventores de que los fibroblastos gingivales podrían remplazar ventajosamente a fibroblastos dérmicos para promover la formación de una dermis en heridas de piel.

- 35 Así, la presente invención está relacionada con un método para tratar una herida de piel en un individuo, que comprende aplicar a la herida de piel una cantidad terapéuticamente eficaz de fibroblastos gingivales.

La presente solicitud también está relacionada con el uso de fibroblastos gingivales para la fabricación de un medicamento pensado para tratar una herida de piel.

En una realización del método y el uso anteriores, también se aplican queratinocitos a la herida de piel.

- 40 En otra realización del método y el uso anteriores, al individuo se le administra al menos un compuesto activador de curación de heridas.

Descripción detallada de la invención

Fibroblastos gingivales

- 45 El experto en la técnica conoce bien procedimientos para coger, cultivar y conservar fibroblastos gingivales y particularmente se describen en el documento Periodontol 77:238-47 de Naveau et al. (2006).

Ventajosamente, se toman muestras de los fibroblastos gingivales y se cultivan fácilmente. Además, los fibroblastos gingivales poseen una alta tasa de expansión.

- 50 Preferiblemente, los fibroblastos gingivales usados en el método según la invención son autólogos, esto es, se cogen del individuo para el que se pretenden aplicar a las heridas. Preferiblemente el individuo es un mamífero y más preferiblemente un humano. Sin embargo, los fibroblastos gingivales también pueden ser alogénicos, esto es, cogidos de otro individuo de la misma especie, o heterólogo, esto es cogidos de otro individuo de otra especie.

Ventajosamente, los fibroblastos gingivales proporcionan una fuente casi ilimitada de fibroblastos autólogos. Además, en caso de quemaduras grandes, los fibroblastos gingivales autólogos usualmente todavía están disponibles, mientras, por el contrario, fuentes de fibroblastos dérmicos autólogos son escasas.

Herida de piel

- 5 Como se pretende en esta memoria una "herida de piel" está relacionada con cualquier ruptura de la epidermis y/o la dermis.

Las heridas de piel según la invención se pueden seleccionar particularmente del grupo que consiste en heridas crónicas, úlceras por presión, úlceras venosas o quemaduras de piel.

- 10 Además heridas de piel según la invención también pueden ser heridas quirúrgicas, es decir, heridas hechas voluntariamente durante un procedimiento quirúrgico. Dichas heridas quirúrgicas abarcan en particular heridas que ocurren en el transcurso de cirugía plástica y reconstructiva o heridas de revisión de cicatrices (p. ej. cicatrices hipertróficas).

- 15 Los procedimientos de cirugía plástica y reconstructiva según la invención pueden ser de cualquier tipo, p. ej. cirugía de mama, cirugía abdominal, cirugía de nariz, cirugía de oreja o retirada de defectos de piel. Como se pretende en esta memoria, defectos de piel están relacionados con una formación anormal de piel que se encuentra en individuos genéticamente predispuestos, o con las consecuencias de un desarrollo anormal de piel durante embriogénesis, y en particular comprenden nevos gigantes, queilosquisis y queloides.

- 20 Como se pretende en esta memoria "tratar una herida de piel" está relacionado con la promoción, la aceleración o la mejora de la curación en el lugar herido, es decir, la formación de una piel funcional en el lugar herido, y/o con la aplicación de un sustituto de piel funcional basado en fibroblasto gingival en el lugar de herida.

Como se pretende en esta memoria una "piel funcional" está relacionada con piel que en particular ha recuperado sus propiedades mecánicas y su función de barrera, con respecto a áreas de piel no heridas.

Aplicación

- 25 Como se pretende en esta memoria "aplicar" está relacionado con poner en contacto o injertar fibroblastos gingivales sobre tejidos expuestos en el lugar de herida.

El contacto o injerto de los fibroblastos gingivales sobre tejidos expuestos en el lugar de herida puede ser realizado según cualquier técnica conocida por el experto en la técnica.

Los fibroblastos gingivales pueden ser depositados directamente en la herida como suspensión celular en líquido o gel, como pulverización, o como cultivo celular en un gel o medio sólido.

- 30 Preferiblemente, el cultivo celular de fibroblastos gingivales es en forma monocapa o tridimensional (3D). En particular, el cultivo celular puede ser un entramado biocompatible sembrado y/o colonizado por fibroblastos gingivales.

- 35 Como se pretende en esta memoria, un entramado biocompatible preferiblemente está relacionado con un entramado que no induce rechazo del organismo en el que es implantado. Más preferiblemente un entramado biocompatible está relacionado con un entramado que no induce la formación de fibrosis. Se prefiere que el entramado biocompatible usado sea bioabsorbible, que sea degradado espontáneamente por el organismo en el que es implantado, preferiblemente después de que el entramado ya no es más útil para el cultivo celular. Preferiblemente, el entramado biocompatible se hace de uno o varios biopolímeros, es decir, polímeros que comprenden al menos una unidad que se puede encontrar en organismos vivos. Materiales para la constitución del entramado biocompatible se pueden seleccionar en particular del grupo constituido por colágeno, proteoglicano, fibrina y quitina. En el marco de la presente invención se prefiere colágeno Tipo I, dadas sus propiedades biocompatibles y bioabsorbibles. Además, el uso de colágeno también es ventajoso dado que puede modular el fenotipo de fibroblasto y promover un comportamiento semejante a in vivo, en particular en lo relativo a la diferenciación, como se describe Nusgens et al. (1984) en Colágeno Rel. 4:351-364.

- 45 Entramados sembrados y/o colonizados por fibroblasto gingival se designan como equivalentes dérmicos en los Ejemplos. Procedimientos generales para la implementación e implantación en heridas de piel de equivalentes dérmicos que comprenden fibroblastos gingivales pueden ser derivados fácilmente del documento Plast. Reconstr. Surg. 101:1891-1903 de Coulomb et al. (1998) por el experto en la técnica.

- 50 Las cantidades de fibroblastos gingivales a aplicar a las heridas pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la técnica dependiendo del modo de aplicación. A modo de ejemplo, para la preparación de un equivalente dérmico de 10 cm x 10 cm basado en un entramado de colágeno, aproximadamente 8×10^6 fibroblastos gingivales de individuo se puede usar para sembrar el entramado.

Queratinocitos

Los queratinocitos son células epidérmicas bien conocidas por el experto en la técnica que constituyen la epidermis.

Los queratinocitos usados en el método según la invención pueden ser aplicados como células individuales o como cultivos celulares o muestras de tejido, tales como biopsias de piel.

5 Como se pretende en esta memoria los queratinocitos pueden ser aplicados antes, simultáneamente y/o posteriormente a los fibroblastos gingivales.

10 En particular, los queratinocitos pueden ser aplicados directamente a la herida una vez se han aplicado los fibroblastos gingivales. Como alternativa, los queratinocitos pueden ser aplicados a la herida como cultivo de células crecido en un cultivo de fibroblastos gingivales. En un caso, después de que se ha aplicado un equivalente dérmico a una herida, se añaden queratinocitos sobre el mismo para formar un equivalente de piel in situ. En otro caso, se prepara un equivalente de piel ex vivo cultivando queratinocitos sobre un equivalente dérmico y el equivalente de piel entero se aplica posteriormente a la herida. Procedimientos generales para aplicar queratinocitos a heridas de piel y para generar equivalentes de piel se describen en el documento Plast. Reconstr. Surg. 101:1891-1903. de Coulomb et al. (1998).

15 Procedimientos para coger, cultivar y conservar queratinocitos son bien conocidos por el experto en la técnica y se describen particularmente en el documento Cell 6:331-343 de Rheinwald et al. (1975).

Preferiblemente, los queratinocitos usados en el método según la invención son autólogos, esto es, se cogen del individuo del se pretenden aplicar a las heridas. Preferiblemente el individuo es mamífero y más preferiblemente un humano. Sin embargo, los queratinocitos también pueden ser alogénicos, esto es, cogidos de otro individuo de la misma especie, o heterólogo, esto es cogidos de otro individuo de otra especie.

20 Los queratinocitos son útiles para la aceleración, o la mejora de curación en el lugar herido, es decir, la formación de una piel funcional en el lugar herido, sin embargo son particularmente ventajosos donde se desea la aplicación de un sustituto de piel funcional basado en fibroblasto gingival en el lugar herido. En el último caso, se prefiere que los queratinocitos sean autólogos.

Compuesto activador de curación de heridas

25 Como se pretende en esta memoria un compuesto activador de curación de heridas está relacionado con cualquier compuesto que tenga la capacidad de promover, acelerar o mejorar la curación de heridas de piel. Tales compuestos se seleccionan preferiblemente del grupo constituido por factores de crecimiento y citocinas.

30 Dentro del marco del método según la invención tales compuestos pueden ser administrados antes, simultáneamente y/o posteriormente a la aplicación de los fibroblastos gingivales. Los compuestos pueden ser administrados por diversas rutas de administración tales como ruta oral, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Como alternativa, los compuestos también pueden ser aplicados directamente a la herida.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Toma de muestras de fibroblastos gingivales

35 Se recuperan fibroblastos de biopsias ya sea usando tratamiento enzimático de la muestra de tejido o por migración de células desde muestras de tejido que han sido colocadas para adherirse sobre un sustrato cultivo celular, en particular como se describe en el documento J. Periodontol. 77:238-47 de Naveau et al. (2006). Entonces se expanden fibroblastos sobre medios de cultivo adaptados según técnicas muy conocidas por el experto en la técnica.

Ejemplo 2

40 Reconstrucción in vitro de un equivalente dérmico: Evaluación de promoción de remodelado tisular

45 Fibroblastos gingivales obtenidos según el Ejemplo 1 se cultivan en presencia de un entramado tridimensional de colágeno según procedimientos generales, tales como el descrito en el documento Plast. Reconstr. Surg. 101:1891-1903 de Coulombetal. (1998) hasta que las fibrillas de colágeno del entramado son contraídas por los fibroblastos gingivales para formar una estructura semejante a tejido, el equivalente dérmico. El equivalente dérmico se obtiene típicamente después de aproximadamente 1 o 2 semanas de cultivo.

Resultados preliminares obtenidos por los inventores indican que los fibroblastos gingivales son más eficientes que los fibroblastos dérmicos para promover la remodelación de tejido.

Ejemplo 3

Reconstrucción in vitro de un equivalente de piel: Evaluación de promoción de epidemización

Un equivalente de piel de dos capas (epidermis + dermis) se produce aplicando biopsias cutáneas calibradas obtenidas como se describe en el documento Br. J. Dermatol. 4:157-168 de Coulomb et al. (1986) como fuente epidérmica, sobre un equivalente dérmico construido como se describe en el Ejemplo 2.

- 5 Este método es adecuado para evaluar cuantitativamente la formación epidérmica midiendo la superficie epidérmica. La formación epidérmica se compara para equivalentes dérmicos obtenidos con fibroblastos dérmicos (control) y fibroblastos gingivales.

Resultados preliminares indican que los fibroblastos gingivales son más eficientes que los fibroblastos dérmicos para promover el crecimiento y la diferenciación de una epidermis.

Ejemplo 4

- 10 Curación de heridas in vivo: Evaluación de promoción de cierre de herida

Se hirieron ratas mediante tres cortes profundos en músculo en los que se aplican respectivamente un entramado de colágeno colonizado por control, un equivalente dérmico obtenido con fibroblastos dérmicos y un equivalente dérmico obtenido con fibroblastos gingivales (Ejemplo 2).

Se monitorizó la velocidad y la calidad de la curación de heridas.

- 15 Resultados preliminares indican que los fibroblastos gingivales son más eficientes que los fibroblastos dérmicos para promover la formación de una neodermis.

Todas las referencias bibliográficas citadas se incorporan en la presente memoria por referencia.

REIVINDICACIONES

1. Fibroblastos gingivales para uso en el tratamiento de heridas de piel en un individuo.
2. Fibroblastos gingivales para uso según la reivindicación 1, en donde la herida de piel se selecciona del grupo constituido por heridas crónicas, úlceras por presión, úlceras venosas o quemaduras de piel.
- 5 3. Fibroblastos gingivales para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde la herida de piel es una herida quirúrgica.
4. Fibroblastos gingivales para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los fibroblastos gingivales se originan en el individuo.
5. Fibroblastos gingivales para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los fibroblastos gingivales se aplican a la herida de piel como cultivo crecido en un entramado biocompatible.
- 10 6. Fibroblastos gingivales para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde los fibroblastos gingivales se asocian a queratinocitos.
7. Fibroblastos gingivales para uso según la reivindicación 6, en donde los queratinocitos se originan en el individuo.
8. Fibroblastos gingivales para uso según la reivindicación 6 o 7, en donde en una primera etapa los fibroblastos gingivales se aplican a la herida de piel como cultivo crecido en un entramado biocompatible y en una segunda etapa los queratinocitos se aplican sobre los fibroblastos gingivales.
- 15 9. Fibroblastos gingivales para uso según la reivindicación 6 o 7, en donde queratinocitos crecen sobre un cultivo de fibroblastos gingivales crecidos en un entramado biocompatible, formando de ese modo un equivalente de piel, y el equivalente de piel se aplica a la herida de piel.
- 20 10. Fibroblastos gingivales para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde los fibroblastos gingivales se asocian a al menos un compuesto promotor de curación de heridas.