



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 117 573**

⑫ Número de solicitud: 9601684

⑬ Int. Cl.⁶: A61F 2/10

A61L 27/00

C12N 5/06

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **19.07.96**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.98**

Fecha de concesión: **11.01.99**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.99**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.02.99

⑲ Titular/es: **Centro Comunitario de
Transfusión del Principado de Asturias
c/ Emilio Rodríguez Vigil, s/n
33006 Oviedo, Asturias, ES**

⑳ Inventor/es: **Meana Infiesta, Alvaro**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Base dérmica especialmente diseñada para el cultivo de queratinocitos.**

㉓ Resumen:

Base dérmica especialmente diseñada para cultivo de queratinocitos.

Se basa en la combinación de colágeno de origen animal y fibrina y fibroplastos de origen humano. Esta dermis permite un desarrollo rápido de los cultivos de queratinocitos que la hacen susceptible del empleo en pacientes con un gran daño porcentual de su superficie corporal. También puede ser utilizada en asociación a una lámina superior impermeable como cobertura provisional de soluciones de continuidad en la piel humana. También puede funcionar como reservorio de factores de crecimiento, antibióticos y otros productos en vista a la más rápida cicatrización de las lesiones y para tratamientos de otras patologías a distancia del lugar del implante.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 117 573 B1

DESCRIPCION

Base dérmica especialmente diseñada para cultivo de queratinocitos.

Estado de la técnica

Desde hace muchos años constituye un reto la obtención de un material óptimo que sustituya la piel humana dañada. Esta sustitución es vital en el caso de los grandes quemados y en la actualidad se logra temporalmente, mediante el uso de aloinjertos de piel de cadáver fresca, crioconservada o glicerolizada (Nanchanal J et al. Br J Plast Surg, 45:354-363, 1992). También se pueden utilizar como cobertura cutánea temporal diversas membranas sintéticas que imitan las estructuras de la piel (Nanchanal J et al. Br J Plast Surg, 45:354-363, 1992). Sin embargo, la sustitución definitiva es todavía un problema no totalmente resuelto. A la larga, la epidermis trasplantada genera una reacción de rechazo que hace que tras su empleo temporal la piel de aloinjerto deba ser sustituida por piel del propio paciente. Es el componente epidérmico, de la piel el que genera el rechazo ya que la dermis, superficie poco celular, es comúnmente admitida por el organismo.

La reparación definitiva de la piel dañada radica, por tanto, en la sustitución por piel del propio paciente. Si las lesiones no son muy extensas esta sustitución puede hacerse por la técnica clásica de autoinjertos: se recoge piel de una zona sana y tras un mallado que permite aumentar su superficie, se coloca en las regiones lesionadas. Pero si el daño es muy amplio este tipo de injerto no puede ser aplicado, siendo la única solución posible el empleo de láminas de queratinocitos obtenidas mediante cultivo celular "in vitro". Esta técnica se aplicó por primera vez en 1984 (Gallico G et al. N Engl J Med, 311:448-451, 1984), siendo posteriormente aplicada ampliamente (De Luca M et al. Burns, 15:303-309, 1989). Brevemente, consiste en obtener queratinocitos aislados a partir de una mínima biopsia. Los queratinocitos en determinadas condiciones crecen formando estructuras poliestratificadas similares a las de la epidermis normal. La gran ventaja de esta técnica es que a partir de 1 cm² de biopsia se han llegado a obtener 10.000 cm² de láminas de queratinocitos en el plazo de 3-4 semanas (Navsaria HA et al. TIB Tech, 13: 91-100, 1995). Los queratinocitos, una vez despegados del frasco de cultivo y trasplantados al lecho de la herida, son capaces de generar una nueva membrana basal semejante a la unión dermoepidérmica normal y quedar permanentemente cubriendo esta superficie (Mommaas A et al. J Invest Dermatol, 99:71-77, 1992). Si bien esta técnica parecía ser la solución definitiva, estudios posteriores demostraron también múltiples inconvenientes (Myers S et al. AM J Surg, 170:75-83, 1995). Para que los queratinocitos lleguen a prender es indispensable generar una nueva unión dermoepidérmica. La unión dermoepidérmica es una estructura compleja, en cuya génesis influyen tanto los queratinocitos trasplantados como los fibroblastos de la dermis (Saintigny G et al. Acta Derm Venereol, 73:175-180, 1993). Así la base de la herida, con un lecho dérmico bueno y no infectado es vital

para que el trasplante tenga éxito.

En resumen, para que la piel quede definitivamente reparada no basta con la reposición de la epidermis obtenida mediante cultivos celulares sino que además es necesario reponer también la dermis dañada, para ello es necesario desarrollar técnicas de cultivo que incluyan tanto el cultivo de epidermis como el de una superficie que imite y funcione como una auténtica dermis.

En el momento actual existen varias superficies descritas que pueden funcionar como dermis artificiales sobre las que los queratinocitos podrían desarrollarse, aunque en ninguna de ellas se logra obtener una superficie de piel suficiente para las necesidades de un paciente con grandes quemaduras. En general estas pseudodermis están basadas en una mezcla de los componentes básicos de la auténtica dermis. Los compuestos más utilizados son:

- Colágeno tipo I de procedencia animal, ya que esta proteína es la más abundante de las presentes en la dermis (Maraguchi T et al. Plast Reconstr Surg, 93:537-544, 1994).
- Condroitin sulfato (Boyce S et al. Surgery, 103: 421-431).
- Fibroblastos humanos (Saintigny G et al. Acta Derm Venereol, 73:175-180, 1993). La presencia de fibroblastos es fundamental para el correcto desarrollo y diferenciación de los queratinocitos sembrados sobre estos geles.

Otro producto utilizado es la fibrina. La fibrina es una proteína cuyo precursor, el fibrinógeno se encuentra disuelto en el plasma. La presencia de esta proteína en la herida no interfiere con el desarrollo de la unión dermoepidérmica. Las láminas de queratinocitos cultivadas que se fijan a la base de la herida con colas orgánicas derivadas del precursor de esta proteína son capaces de prender y epitelizar definitivamente la zona (Auger FA et al. B J Plast Surg, 46:136-142, 1993). También se ha demostrado que en los geles de fibrina los fibroblastos son capaces de crecer y sintetizar múltiples factores de crecimiento probablemente similares a los que los fibroblastos segregarán "in vivo" y el gel mismo de fibrina podría servir como reservorio de otras sustancias (factores de crecimiento, antibióticos ...) que favorezcan la cicatrización correcta de la herida donde se aplica (Deblois C et al. Biomaterials, 15:665-672, 1994). Dadas estas características se propuso que los geles de fibrina a los que se asocian fibroblastos podrían utilizarse como bases dérmicas.

Dos son los problemas asociados al uso de geles de colágeno como dermis artificial. Uno es la retracción del gel producida por las proteasas sintetizadas por los fibroblastos. La segunda gran limitación es la necesidad de gran número de queratinocitos por cm² para que el cultivo epidérmico sea viable. Estas 2 condiciones impiden que a partir de una pequeña biopsia se obtenga en pocas semanas la superficie de "piel completa" suficiente para cubrir las lesiones de un gran quemado.

Los geles basados en fibrina y fibroblastos per-

miten un rápido crecimiento de los queratinocitos, pero tienen el inconveniente de su extrema fragilidad. A partir del 5°-6° día de cultivo la fibrina de estos geles ha sido casi totalmente digerida siendo imposible su manejo y trasplante al paciente.

El desarrollo de una base dérmica que permita cultivar sobre ella los queratinocitos con las mismas posibilidades de expansión que tiene el cultivo clásico de queratinocitos aislados, ofrece una nueva alternativa terapéutica en los pacientes afectados de patologías cutánea tanto agudas (quemados) como crónicas (úlceras cutáneas).

Breve descripción de la invención.

Es objeto de la presente invención el desarrollo de una base dérmica basada en la asociación en un mismo gel de colágeno tipo 1 extraído a partir de tendón de mamífero, fibrina obtenida por la transformación del fibrinógeno humano tras añadirle trombina bovina e iones Ca^{++} y fibroblastos de origen humano.

Esta asociación presenta, frente a las asociaciones previamente descritas, las siguientes ventajas:

- Conserva las características de los geles de fibrina, que permiten un crecimiento rápido de los queratinocitos y en los que los fibroblastos crecen segregando sustancias que favorecen "in vitro" el desarrollo de una unión dermoepidérmica. Este gel asociado a sustancias como factores de crecimiento, antibióticos..., mejora el lecho de la lesión favoreciendo la curación de la herida. Asimismo, la asociación de este gel con sustancias como factores de crecimiento, antibióticos u otras puede favorecer el tratamiento de patología a distancia. Por otra parte, la fibrina impide o minimiza los efectos de la retracción del colágeno.
- Conserva las características propias de los geles de colágeno favoreciendo la integración del cultivo en el lecho de la herida. El colágeno impide la reabsorción de fibrina observada en los geles realizados exclusivamente de fibrina y fibroblastos.
- Por último, esta asociación produce un gel lo suficientemente elástico y resistente para manejarlo con facilidad y transportarlo sin ruptura desde el laboratorio al lecho del paciente. Este gel puede, unido a una fina capa de material impermeable e inerte (silicona ...), ser utilizado en presencia ó en ausencia de factores de crecimiento celular como cobertura temporal de las lesiones cutáneas. Por sus características biológicas y ser fácilmente accesibles, estos geles pueden servir de soporte a células (fibroblastos u otras estirpes celulares, incluyendo células genéticamente modificadas) con capacidad de producir proteínas útiles en diversas patologías.

Descripción detallada de la invención.

La base utilizada como dermis consta de la

siguiente composición:

- 1) Colágeno tipo I.
- 2) Fibrina.
- 3) Fibroblastos.

El colágeno se obtiene a partir de tendones de mamíferos (rata, bovinos o humano). El método más comúnmente empleado es el de disolución de los tendones en una solución de ácido acético. Este colágeno disuelto puede fácilmente almacenarse en forma de liofilizado.

La fibrina se obtienen a partir de su precursor sanguíneo, el fibrinógeno. Se ha utilizado el fibrinógeno de origen humano obtenido a partir de crioprecipitados y el fibrinógeno comercializado en las denominadas colas orgánicas de fibrina, de amplio uso en la clínica quirúrgica.

El paso de fibrinógeno a fibrina se realiza mediante la adición de trombina de origen bovino e iones Ca^{++} .

El origen de los fibroblastos humanos es el de prepucios obtenidos por intervenciones de fimosis, previa autorización del uso de los mismos del paciente o de sus representantes legales.

Para obtener el gel es necesario mezclar estos 3 componentes. Para ello se redisuelve el colágeno liofilizado en una solución de ácido acético, solución que se neutraliza con la adición de NaOH. Por otra parte, se disuelven los fibroblastos en medio de cultivo al cual se añade la solución de trombina y sales de calcio. Estos componentes se mezclan con el colágeno previamente neutralizado. Una vez efectuada la mezcla se añade el fibrinógeno y la trombina en las concentraciones adecuadas y rápidamente esta mezcla se pasa a un frasco de cultivo celular y se deja en la estufa a 37°C durante 1 hora hasta que el gel esté totalmente formado. Al cabo de este tiempo el gel se ha solidificado pudiendo cubrirse con medio de cultivo completo y reservarse 24-48 horas. En el caso de que se necesite una gran superficie de cultivo y que los queratinocitos tengan que cultivarse durante más de 12 días sobre este gel, una vez solidificado y antes de añadir el medio de cultivo, se cubrirá con una leve capa de fibrina con fibroblastos (producida por la adición de trombina y sales de calcio al fibrinógeno en el que previamente se han disuelto fibroblastos humanos) esperando otra hora para que este gel esté completamente solidificado para añadir el medio de cultivo. La adición de esta segunda capa de fibrina estabiliza más el gel, facilita el crecimiento de los queratinocitos y permite alargar los días de cultivo a más de 2 semanas sin que se aprecie reducción significativa del volumen del gel ni retracción del mismo.

Los geles producidos se guardan a 37°C en estufa de CO_2 al 5% hasta su utilización un máximo de 48 horas.

En la presente invención se han utilizado 2 tipos de geles, uno basado en la mezcla de fibrina, colágeno y fibroblastos (figura 1) y el segundo, semejante al primero, al que se le añade una fina capa de fibrina y fibroblastos (Figura 2).

La figura 1 muestra una matriz (B) formada por la mezcla de colágeno tipo I y fibrina. En el interior de la matriz se presentan esquematizados los fibroblastos humanos (A).

En la figura 2 se muestra una matriz (B) de fibrina y colágeno tipo I con fibroblastos (A) en su interior. Sobre la matriz se observa una nueva capa de fibrina (C) sin adición de colágeno tipo 1 en la que también están presentes fibroblastos humanos (A).

Modo de realización de la invención.

Los materiales básicos se obtienen de la siguiente manera:

- 1) Colágeno tipo I.
- 2) Fibrina.
- 3) Fibroblastos.

1) El colágeno extraído a partir de tendones de mamífero siguiendo el siguiente procedimiento:

Los tendones se diseccionan del animal mediante técnica estéril, una vez obtenidos se lavan 2 veces en agua destilada y se trocean en pequeños fragmentos.

Se pesa el material obtenido y se incuba el material en ácido acético 0.01% (100 ml de ácido por g de tejido) durante 48 horas a 4°C en un agitador magnético.

La solución obtenida se clarifica por centrifugación (30 minutos a 30.000xg). Se liofiliza y se conserva a 4°C hasta su utilización.

2) Se utilizan 2 fuentes de fibrina.

Las colas de fibrina comercializadas (Tissucol^R, Laboratorios Inmuno) que presentan una alta concentración de fibrinógeno liofilizado y fibrina obtenida en nuestro laboratorio a partir de crioprecipitados. La técnica de fabricación del crioprecipitado es la siguiente:

A partir de plasma fresco obtenido mediante fraccionamiento primario de las unidades de sangre se procede a una congelación rápida en baño de etanol a 70°C. Posteriormente se descongela lentamente a 4°C durante 24 horas y se procede a la centrifugación refrigerada para recuperar el crioprecipitado en el fondo de la bolsa; se elimina el plasma sobrenadante salvo 10 ml para facilitar la vehiculación del crioprecipitado. Se homogeneiza y se conserva durante 1 año a 30°C. El crioprecipitado así preparado contiene aproximadamente un fibrinógeno total de entre 150 y 250 mg.

Disolución del crioprecipitado.

El crioprecipitado es calentado en un baño a 37°C y rápidamente centrifugado, a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. El pellet es disuelto en 10 ml de suero salino. Se diluye el fibrinógeno calentándolo hasta 37°C. Una vez disuelto el fibrinógeno se calcula su concentración.

3) Obtención de fibroblastos humanos.

Diversas líneas de fibroblastos humanos se obtendrán a partir de prepucios humanos obtenidos tras cirugía programada de fimosis. La pieza es recogida en medio de transporte (DMEN, suero fetal de bovino 10%, penicilina 100 u/ml, estreptomicina 100 µg/ml). En el laboratorio se lava 3

veces en PBS estéril y se trocea cuidadosamente, se coloca en 30 ml de solución de tripsina 0.05%-EDTA 0.02% bajo agitación a 37°C.

Cada 30 minutos se recoge la tripsina y se cambia por tripsina fresca. La tripsina es neutralizada mediante la adición de medio de cultivo completo (DMEM, 10% suero bovino fetal). Se repite la operación hasta que no se obtengan mas células. Las células obtenidas se colocan en un frasco de cultivo a una densidad de 100.000 células por cm² de superficie de cultivo. Cada 72 horas se cambia el medio hasta que las células estén confluentes. A la confluencia las células son tripsinizadas y se realizan cultivos secundarios en proporción de crecimiento de dos frascos de cultivo por un frasco de cultivo del pase anterior. A partir de que las células muestren una monocapa de células semejantes a los fibroblastos una parte de las mismas se congelan, según técnica habitual y se guardan en crioviales en nitrógeno líquido. Los pases idóneos para la utilización de estos fibroblastos son entre el 4° y el 12°.

Una vez obtenidos los materiales básicos se procede a la elaboración del gel.

El cálculo proporcionado es el empleado en la fabricación de una base dérmica suficiente para un frasco de cultivo de 75 cm². Para otras dimensiones se utilizarán los mismos valores reduciéndolos o ampliándolos proporcionalmente a la superficie del frasco de cultivo.

Colágeno: 30 mg de colágeno liofilizado se disuelven en 10-15 ml de ácido acético 0.01%. Una vez disueltos se dejan sobre hielo.

4 ml de esta solución se mezclan con 0.1 ml de Na OH 1M a ellos se añaden 1 ml de solución de Cl₂Ca 0.025 M en los que previamente se ha disuelto 10 UI de trombina bovina, 1 ml de solución de aprotinina (10.000 U/ml) y medio de cultivo de fibroblastos conteniendo entre 1.000.000-1.500.000 células, hasta completar un volumen de 13 ml. Se mezclan todos los reactivos y se añaden entre 40 y 75 mg de fibrinógeno, bien por la adición de 2-3 ml de crioprecipitado o de fibrinógeno obtenido a partir de diluir un preparado comercial de fibrina. La solución es puesta rápidamente en el frasco de cultivo distribuyéndose homogéneamente por su superficie. El frasco se deja en estufa de CO₂ a 37° hasta que el gel se polimerice. La concentración final aproximada de este gel es de 3-5 mg de fibrinógeno/ml. El gel contiene aproximadamente entre 1.000.000-1.500.000 fibroblastos. En el caso de utilizar el segundo modelo de gel descrito, aquel que además tiene una capa de fibrina y fibroblastos por encima de la capa de fibrina, colágeno y fibroblastos se procede de la siguiente manera: una vez que el gel esta totalmente solidificado (entre 60 y 120 minutos a 37° en estufa) se disuelven 2-3 ml de crioprecipitado en medio de cultivo que contiene entre 500.000-1.000.000 fibroblastos y 10.000 U de aprotinina, ajustando el volumen final a 14 ml. A esta mezcla se añade 1 ml de solución de Cl₂Ca 0.025 M en los que previamente se ha disuelto 10 UI de trombina bovina. 7.5 ml de esta solución se distribuye rápidamente sobre el primer gel agitando suavemente para asegurar una distribución uniforme.

Una vez polimerizado (unos 60 minutos) se cubre de medio de cultivo y se deja en la estufa hasta su utilización.

Los queratinocitos se siembran sobre este gel una vez retirado el medio de cultivo a una den-

sidad extremadamente variable dependiendo del grado de expansión requerido. El medio de cultivo de queratinocitos variará en función de la técnica de cultivo de queratinocitos empleada.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de la asociación de colágeno de origen animal, fibrina y fibroblastos humanos para la preparación de una base dérmica.

2. Uso de la asociación de colágeno de origen animal, fibrina y fibroblastos humanos para la preparación de una base dérmica, según la reivindicación 1, **caracterizada** por su idoneidad para el cultivo de queratinocitos.

3. Uso de la asociación de colágeno, de origen animal, fibrina y fibroblastos humanos para la preparación de una base dérmica según la reivindicación 1, **caracterizada** por la posibilidad de asociar en su superficie membranas sintéticas inertes y ser utilizada como substitutivo cutáneo provisional para el tratamiento de lesiones agudas o crónicas de la piel humana.

4. Uso de la asociación de colágeno de origen animal, fibrina y fibroblastos humanos para la preparación de una base dérmica según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** por la posibilidad de asociar a su composición sustancias tales como factores de crecimiento, antibióticos u otras y favorecer tanto el tratamiento local del tejido adyacente como el tratamiento de patología a distancia.

5. Uso de la asociación de colágeno de origen animal, fibrina y fibroblastos humanos para la preparación de una base dérmica según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada** por la posibilidad de asociar a ella otras células, incluyendo células modificadas por ingeniería genética, capaces de sintetizar sustancias proteicas de interés terapéutico.

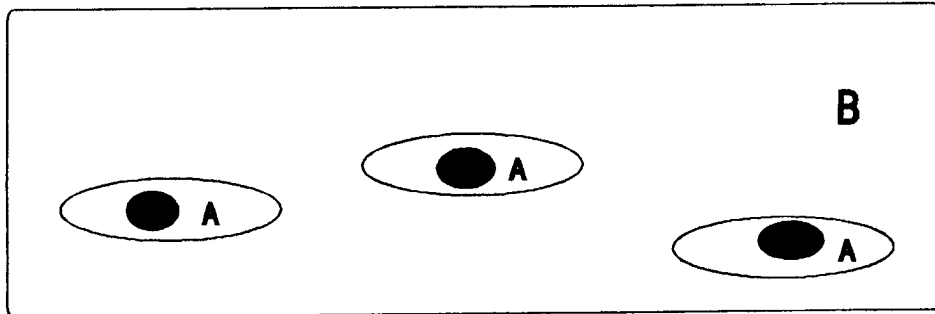


FIGURA 1

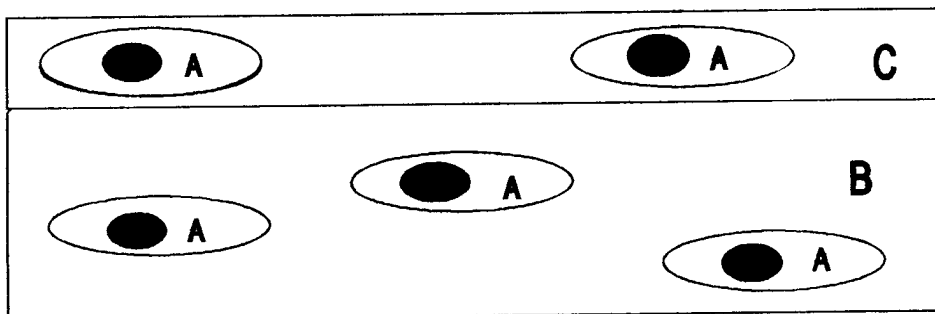


FIGURA 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 117 573
⑫ N.º solicitud: 9601684
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 19.07.96
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: A61F 2/10, A61L 27/00, C12N 5/06

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP-0344924-A (ORGANOGENESIS INC.) 06.12.89 * Todo el documento; en especial reivindicaciones 6,7 *	1-5
A	US-5282859-A (EISENBERG) 01.02.94 * Todo el documento *	1-5
A	US-4485096-A (BELL) 27.11.84 * Todo el documento *	1-5
A	WO-8001350-A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 10.07.80 * Todo el documento *	1-5
A	US-4683142-A (ZIMMERMANN) 28.07.87 * Todo el documento *	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
30.06.98

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/1