



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 034**

51 Int. Cl.:
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/60 (2006.01)
A61L 15/40 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05022145 .6**
86 Fecha de presentación : **15.04.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **1640024**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Soporte revestido de células.**

30 Prioridad: **16.04.1997 US 840804**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

73 Titular/es:
The Regents of the University of Michigan
3003 South State Street
Ann Arbor, Michigan 48109-1280, US

72 Inventor/es: **Rees, Riley S.;**
Marcelo, Cynthia;
Adamson, Belinda y
Rhodes, Lenore

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 292 034 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

Soporte revestido de células.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a la curación y regeneración de tejidos y, más en particular, a procedimientos y sistemas para curar heridas. En particular se refiere a un sistema para el tratamiento de heridas que comprende:

- 10 (a) células sobre un soporte sólido, en el que las mencionadas células se seleccionan entre el grupo constituido por fibroblastos, células endoteliales, melanocitos, células de músculos lisos, fibroblastos fetales y células epiteliales; y
- 15 (b) una envoltura que comprende material de malla que tiene poros, envoltura que aloja el mencionado soporte sólido, en el que la mencionada envoltura está sellada para impedir que el mencionado soporte sólido salga de la mencionada envoltura,

y al uso de células sobre un soporte sólido, en el que las mencionadas células se seleccionan entre el grupo constituido por fibroblastos, células endoteliales, melanocitos, células de músculos lisos, fibroblastos fetales y células epiteliales, y en el que las mencionadas células están contenidas dentro de una envoltura que comprende un material de malla que tiene poros, proporcionándose así una envoltura sellada que contiene poros, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de heridas.

25 **Antecedentes de la invención**

El objetivo principal del tratamiento de heridas es conseguir el cierre de la herida. Las heridas cutáneas abiertas representan una categoría importante de heridas y entre ellas están incluidas heridas de quemaduras, úlceras neuropáticas, úlceras debidas a opresión, úlceras de estasis venosa y úlceras diabéticas. Rutinariamente, las heridas cutáneas abiertas se curan por un procedimiento que comprende seis componentes principales: (i) inflamación, (ii) proliferación de fibroblastos, (iii) proliferación de vasos sanguíneos, (iv) síntesis de tejido conectivo, (v) epitelización y (vi) contracción de la herida. La curación de heridas empeora cuando estos componentes, individualmente o en conjunto, no funcionan apropiadamente. Numerosos factores pueden afectar a la curación de heridas, entre ellos mala nutrición, infección, agentes farmacológicos (por ejemplo, actinomicina y esteroides), diabetes y edad avanzada (véase Hunt y Goodson en *Current Surgical Diagnosis & Treatment* (Way; Appleton & Lange), págs. 86-98 (1988).

Las heridas que no se curan fácilmente son objeto de considerable tensión física, emotiva y social así como de grandes gastos financieros (véase, por ejemplo, Richey y otros, *Annals of Plastic Surgery* 23(2):159-165 (1989)). De hecho, las heridas que no se curan apropiadamente y llegan a infectarse pueden requerir la escisión del tejido afectado. Se han desarrollado varias modalidades de tratamiento a medida que ha progresado el conocimiento básico de los científicos sobre las heridas y los mecanismos de curación de las heridas.

La modalidad convencional más comúnmente usada para ayudar a la curación de heridas implica el uso de apósitos para las heridas. En la década de los 60, un cambio importante en el cuidado de heridas se produjo cuando se descubrió que la curación de heridas con un apósito húmedo oclusivo era, hablando en general, más eficaz que el uso de apósitos secos no oclusivos (Winter, *Nature* 193:293-94 (1962)). Hoy en día se usan rutinariamente numerosos tipos de apósitos, incluidas películas (por ejemplo, películas de poliuretano), hidrocoloides (partículas coloidales hidrófilas unidas a espuma de poliuretano), hidrogeles polímeros reticulados que contienen aproximadamente como mínimo 60% de agua), espumas (hidrófilas e hidrófobas), alginatos cálcicos (materiales compuestos de fibras de alginato cálcico, no tejidos) y celofán (celulosa con un plastificante) (Kannon y Garrett, *Dermatol. Surg.* 21:583-590 (1995); Davies, Burns, 10:94 (1983)). Desafortunadamente, ciertos tipos de heridas (por ejemplo, úlceras diabéticas, laceraciones debidas a opresión) y las heridas de ciertos sujetos (por ejemplo, receptores de corticoesteroides exógenos) no curan a tiempo (si curan) usando tales apósitos.

En un intento de mejorar la curación de heridas, se han utilizado varias modalidades farmacéuticas. Por ejemplo, algunos médicos han usado regímenes de tratamiento que implican el uso de sulfato de zinc. Sin embargo, la eficacia de estos regímenes se ha atribuido principalmente a la inversión de los efectos de niveles subnormales de zinc en suero (por ejemplo, resistencia aminorada del huésped y actividad bactericida intracelular alterada) (Riley, *Am. Fam. Physician* 24:107 (1981)). Si bien otras deficiencias de vitaminas y minerales se han asociado también con una curación disminuida de heridas (por ejemplo, deficiencias en vitaminas A, C y D; y de calcio, magnesio, cobre y hierro), no hay evidencia fuerte de que el aumento de los niveles en suero de estas sustancias por encima de los niveles normales intensifica sustancialmente la curación de heridas. Así, excepto en circunstancias muy limitadas, la promoción de la curación de heridas con estos agentes ha tenido poco éxito. El documento WO-A-96/12510 describe un material de trasplante para el tratamiento de heridas que comprende un biomaterial que contiene células epiteliales unidas a microvehículos.

Lo que se necesita es un medio seguro, eficaz e interactivo para intensificar la curación de heridas crónicas. El medio debe ser capaz de ser usado sin considerar el tipo de herida o la naturaleza de la población de pacientes a la que pertenece el sujeto.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones y está dirigida a sistemas y procedimientos para intensificar la curación de heridas, especialmente heridas crónicas (por ejemplo, heridas diabéticas llagas, debidas a opresión).

5 La presente invención no está limitada por la naturaleza del soporte sólido; obviamente, la presente invención contempla el uso de cualquier soporte o matriz tridimensional (por ejemplo, matrices que comprenden glicosaminoglicanos) al que se adherirán células seleccionadas entre el grupo constituido por fibroblastos, células endoteliales, melanocitos, células de músculos lisos, fibroblastos fetales y células epiteliales se adherirán, y en el que se dividirán y mantendrán sus comportamientos funcionales (por ejemplo, curación de heridas).

15 En realizaciones preferentes, el soporte sólido comprende perlas revestidas con colágeno. En realizaciones particulares, las perlas revestidas con colágeno se ponen en una envoltura, bolsa o recipiente similar que tiene poros, y la envoltura se pone luego en el sitio de la herida para uso como un promotor interactivo de la curación de la herida. La presente invención no está limitada por la naturaleza de la envoltura; sin embargo, en una realización, los poros son lo bastante grandes como para permitir que las células de las perlas salgan de la envoltura a la herida, mientras que en otra realización, los poros son demasiado pequeños para que las células salgan de la envoltura pero lo bastante grandes para que puedan permitir que factores celulares salgan de la envoltura, o componentes fluidos de la herida entren en la envoltura. En ciertas realizaciones, las envolturas se reemplazan cada unos pocos días hasta que se curan las heridas.

20 En realizaciones adicionales, la envoltura comprende un material de malla que tiene poros. En ciertas realizaciones, el material de malla comprende poliéster. En una realización, los poros son lo bastante grandes para permitir que las células de las perlas salgan de la envoltura a la herida, mientras que, en otra realización, los poros son demasiado pequeños para permitir que las células de las perlas salgan de la envoltura pero lo bastante grandes para que permitan que factores celulares (por ejemplo, citoquinas) salgan de la envoltura o que componentes fluidos de la herida entren en la envoltura.

25 Además, en otras realizaciones, la envoltura comprende una membrana biocompatible. En realizaciones adicionales, el medio de eliminación comprende un asa o un brabante unido a la envoltura.

Definiciones

Para facilitar la comprensión de la invención expuesta en la descripción siguiente se definen ahora varios términos.

35 El término “herida” se refiere en general a lesiones de la piel y el tejido subcutáneo iniciadas de diferentes formas (por ejemplo, llagas debidas a opresión por una permanencia prolongada en cama o heridas inducidas por un trauma) y con características variables. Las heridas se pueden clasificar en cuatro grandes grados dependiendo de la profundidad de la herida: (i) grado I: heridas limitadas al epitelio; (ii) grado II: heridas que se extienden a la dermis; (iii) grado III: heridas que se extienden al tejido subcutáneo; y (iv) grado IV (o heridas de espesor entero) heridas en que quedan expuestos los huesos (por ejemplo, un punto de opresión descrandado tal como trocánter mayor o sacro). El término “herida de espesor parcial” se refiere a heridas que abarcan los grados I-III; entre los ejemplos de heridas de espesor parcial figuran heridas de quemaduras, llagas debidas a opresión, úlceras de estasis venosa y úlceras diabéticas. El término “herida profunda” incluye las heridas de grado III y grado IV.

45 El término “herida crónica” se refiere a una herida que no se ha curado en 30 días.

La frase “poner en posición la envoltura en la herida” significa poner en contacto alguna parte de la herida con la envoltura. “Que contiene” incluye, aunque no únicamente, poner la envoltura en la proximidad de la herida de manera que las células estén en comunicación fluida con la herida.

50 Las frases “promover la curación de heridas”, “intensificar la curación de heridas” y otras similares se refieren a la inducción de la formación de tejido de granulación o la contracción de heridas y/o la inducción de la epitelización (esto es, la generación de nuevas células del epitelio).

55 La frase “contenido de fluidos de la herida” se refiere a líquido asociado con una herida, así como células, factores de células, iones, macromoléculas y material proteínico en suspensión tal como líquido en el sitio de la herida.

El término “sujeto” se refiere a seres humanos y animales.

60 Los términos “envoltura”, “compartimento” y otros similares se refieren, en general, a cualquier recipiente capaz de contener un soporte sólido revestido con células dentro de un lugar delimitado, que permite que factores celulares salgan de la envoltura a la herida y que entren contenidos líquidos de la herida. En realizaciones preferentes, la envoltura es una bolsa de malla estéril hecha de una malla de poliéster tejida de calidad médica. En una realización, la presente invención contempla una envoltura degradable (esto es, una envoltura que se deshace con el tiempo). Además, la presente invención contempla una envoltura construida con membranas. Después de situar el soporte sólido que contiene células (por ejemplo, que crecen sobre la superficie del soporte sólido o dentro del soporte sólido) dentro de la envoltura, se cierra la envoltura para prevenir que el soporte sólido salga de la envoltura. En una realización, la envoltura cerrada comprende además un medio de transporte para transportar factores celulares (por ejemplo, fuera de

la envoltura y a la herida). Si bien la presente invención no está limitada a un medio de transporte particular, el medio de transporte puede incluir un medio para aplicar presión (por ejemplo una bomba).

5 El término “soporte sólido” se refiere en general a cualquier soporte que permite el crecimiento de células, incluidas, aunque no limitativamente, perlas de microvehículos, geles e insertos de placas de cultivo. Las perlas de microvehículo adecuadas para uso con la presente invención son asequibles de varias fuentes, entre ellas Sigma, Pharmacia e ICN. Los insertos de placas de cultivo (por ejemplo, matrices soporte de células que generalmente comprenden una membrana que soporta el crecimiento de células) son asequibles comercialmente de, entre otras fuentes, Collaborative Biomedical Products, Coslar, ICN y Millipore. En realizaciones preferentes, los insertos de placas de cultivo
10 comprenden una membrana microporosa permeable que permite la difusión libre de iones y macromoléculas.

15 El término “soporte sólido trasplantable” se refiere a un soporte sólido que contiene células que se puede poner dentro de una envoltura. La envoltura que contiene el soporte sólido que contiene células se puede poner luego en una herida para promover la curación de la herida.

Las frases “medio para separar”, “medio de separación” y similares se refieren en general a cualquier mecanismo útil para ayudar a retirar de una herida una envoltura que contiene células (y/o a poner en una herida la envoltura que contiene células). En algunas realizaciones, el medio para separar la envoltura comprende un asa, un hilo, un brabante, un cordel o similar que está unido a la envoltura; en realizaciones preferentes, el medio de separación está unido a un
20 agarradero que se puede usar como ayuda para poner la envoltura que contiene el soporte sólido dentro de la herida y para retirarla.

25 El término “apósito” se refiere en general a cualquier material aplicado a una herida para protección, como absorbente, drenaje, etc. Comercialmente hay disponibles numerosos tipos de apósitos, incluidas películas (por ejemplo, películas de poliuretano), hidrocoloides (partículas hidrófilas coloidales unidas a espuma de poliuretano), hidrogeles (polímeros reticulados que contienen aproximadamente como mínimo 60% de agua), espumas (hidrófilas o hidrófobas), alginatos cálcicos (materiales compuestos no tejidos de fibras de alginato cálcico) y celofán (celulosa con un plastificante) (Kannon y Garrett, Dermatol. Surg. 21:583-590 (1995); Davies, Burns 10:94 (1983)). La presente invención contempla también el uso de apósitos impregnados con compuestos farmacológicos (por ejemplo, antibióticos).

30 El término “biocompatible” significa que hay un efecto mínimo (esto es, no hay diferencia significativa en comparación con el control), si es que hay alguno, sobre el ambiente. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la presente invención, la envoltura comprende una membrana biocompatible; la membrana tiene en sí un efecto mínimo sobre las células del soporte sólido dentro de la membrana y sobre el sujeto (esto es, no tiene un impacto perjudicial sobre la salud del sujeto o la velocidad de curación de la herida) después de poner la envoltura sobre la herida.
35

40 El término “matriz extracelular” se refiere en sentido amplio a material para soportar el crecimiento de células. No se pretende que la presente invención se limite a un material particular, puesto que la presente invención contempla una amplia variedad de materiales, incluido, aunque no únicamente, material que se distribuye en el cuerpo de organismos multicelulares, tal como glicoproteínas, proteoglicanos y carbohidratos complejos. La presente invención contempla el uso de un sustrato de matriz extracelular con los insertos de cultivos sobre los que se cultivan las células. Aunque la presente invención no está limitada por la naturaleza de la matriz extracelular, entre las matrices extracelulares preferidas están incluidas Matrigel, Growth Factor Reduced Matrigel, colágeno fibrilar, laminina, fibronectina y colágeno de tipo IV. El colágeno es la matriz extracelular más preferida para uso con la presente invención. Sin embargo, la
45 presente invención no está limitada al uso de colágeno ni al uso de soportes sólidos comerciales que están revestidos con colágeno u otras matrices extracelulares.

Descripción del dibujo

50 La Figura representa esquemáticamente una realización de una bolsa de té contemplada para uso con los soportes sólidos que contienen células de la presente invención. Una envoltura, 1, está conectada a un medio de separación, 2 y 3, y contiene el soporte sólido 4. En esta realización, el medio de separación comprende un brabante 2 y un agarradero 3 conectado al brabante.

55 Descripción de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere en general a la curación y regeneración de tejidos y, más en particular, a procedimientos y sistemas para la curación de heridas.

60 Los ejemplos de células incluyen las células presentadas en la Tabla 1.

ES 2 292 034 T3

TABLA 1

Tipo de células	Tejido	Factor de crecimiento de citocrina/responde a	Interacciones de la matriz	Potencial de curación de heridas
Fibroblasto	Organos viseral de la dermis	TGF-beta, PDGF, IGF, IL-1, FGF, CTGF	Colágeno tipo I, II y IV, elastina, fibronectina, nidogén, SPARC, osteonectina, protengliconas glucosamino-gliconas, colagenasas, estromelsina, TIMP, tromboespondina	Fibroblasto *4
Célula endotelial	Vasos sanguíneos	FGF, VEGF, endotelina, IGF, IL-1	TIMP, GAG, elastina, laminina, colagenasa, colágenos de tipo IV, fibronectina	Célula endotelial *4
Melanocito	Dermis	IL-1, MSH	Sin producción de ECM	Melanocito *1
Célula de músculo liso	Vasos sanguíneos	PGDG, IGF, EGF, FGF	TIMP, GAG, elastina, laminina, colagenasa, colágenos, fibronectina	Célula *3 de músculo liso
Fibroblasto Fcta 1	Mesenquima fetal	FGF, TGF-beta, PDGF, ILGF, IL-1, FGF	TIMP, GAG, elastina, laminina, colagenaza, colágenos, fibronectina	Fibroblasto fetal *3
Célula epitelial	Mucosa de dermis	FGF, TGF-alfa, TGF-beta, PDGF, IGF, IL-1-EGF, FGF, KGF IFN gamma, TNF-alfa, IL-1 alfa, activina	TIMP, GAG, elastina, laminina, colagenasa, colágenos tipo IV, VI, VII, lamininas fibronectina, epiligrina, nidogeno, elastina, tenascina, tromboespondina, GAGs, proteogliconas, EMMPRIN, SPARC, uPA, PAI, colagenasa, gelatinasa, estromelisinina	Célula epitelial *4

65

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

5	Citoquinas, factores de crecimiento hechos/ responde a	Interacciones de la matriz
10	TGF Factor de transformación del crecimiento	TIMP Inhibidor de tejido de metaloproteinasas
	PDGF Factor de crecimiento derivado de plaquetas	GAG Glucosa aminoglicanos
15	IGF Factor de crecimiento de tipo insulina	SPARC Proteína secretada ácida y rica en cisteína
	IL Interleuquina	ECM Matriz extracelular
20	FGF Factor de crecimiento de fibroblastos	EMMPRIN Inductor de metaloproteinasa de matriz extracelular
	CTGF Factor de crecimiento de tejido conectivo	uPA Activante de plasminógeno de tipo uroquinasa
25	VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular	PAI Inhibidor de activante de plasminógeno
	MSH Hormona estimuladora de melanocitos	
30	EGF Factor de crecimiento epidérmico	
	KGF Factor de crecimiento de queratinocitos	
35	IFN Interferón	

I. *Crecimiento de células sobre soportes sólidos*

Las células contempladas para uso con la presente invención se hacen crecer sobre soportes sólidos trasplantables.

La presente invención no está limitada por la naturaleza del soporte. Los procedimientos de la presente invención se pueden practicar junto con cualquier soporte que permita el crecimiento de células, incluidos, aunque no únicamente, perlas microvehículo, geles e insertos de placas de cultivo. Cuando se desean perlas microvehículo, hay disponibles comercialmente perlas adecuadas en varias fuentes; por ejemplo, Sigma vende perlas revestidas con colágeno y perlas revestidas con gelatina, Pharmacia vende perlas basadas en dextrano e ICN anuncia perlas de colágeno.

Además, hay disponibles comercialmente insertos de placas de cultivo (por ejemplo, matrices soporte de células que generalmente comprenden una membrana que soporta el crecimiento de células) de, entre otras fuentes, Collaborative Biomedical Products, Coslar, ICN y Millipore. Frecuentemente, tales insertos comprenden poli(tereftalato de etileno), policarbonato, TEFLON® (Gore) y ésteres de celulosa mezclados. En realizaciones particulares, los insertos de placas de cultivo comprenden una membrana microporosa permeable que permite la difusión libre de iones y macromoléculas.

Como se ha indicado antes, la presente invención contempla el uso de soportes sólidos trasplantables.

El uso de soportes sólidos trasplantables para aplicación a heridas ha sido descrito en la técnica. Por ejemplo, Hansbrough y otros (J. Am. Med. Assoc. 262:2125 (1989)) describen membranas de colágeno-glucosamina revestidas con queratinocitos para aplicación en heridas. (Véase también Cooper y otros, J. Surg. Res. 48:528 (1990); Ronfard y otros, Bums 17:181 (191); Tinois y otros, Exp. Cell Res. 193:310 (1991), y Nanchahal y Ward, Brit. J. Plas. Surg. 45:354 (1992)).

En términos generales, el crecimiento de células "dependientes de anclaje" requiere unión a una superficie y esparcimiento con el fin de que crezcan. Convencionalmente, tales células se han cultivado sobre las paredes de recipientes no agitados (por ejemplo, matraces de cultivo de tejidos) y botellas rodillo (patente U.S. n.º. 5.52.474, expedida a Clapper y otros).

ES 2 292 034 T3

En algunas realizaciones, la presente invención contempla el uso de biorreactores para crecimiento de células (véase patente U. S. n.º. 5.459.069, expedida a Palsson y otros, y patente U.S. n.º. 5.563.068, expedida a Zhang y otros, incorporadas ambas a esta memoria por referencia). Algunos biorreactores utilizan sistemas de fibras huecas. Frecuentemente, haces de fibras paralelas se encierran en un compartimiento exterior; las células crecen sobre la superficie exterior de las fibras mientras que un medio nutriente y enriquecido con gas fluye a través del centro de las fibras huecas, alimentando así las células (véase, por ejemplo, patente U.S. n.º. 5.512.474 expedida a Clapper y otros).

Además, con la presente invención se pueden usar biorreactores que utilizan microvehículos (por ejemplo, perlas de dextrano derivadas de DEAE). En realizaciones preferentes, para anclar las células al soporte sólido se usan proteínas como colágeno, fibronectina y laminina; el adhesivo más preferido para las células es colágeno. Los microvehículos pueden incorporar también una carga iónica para coadyuvar a la fijación de las células al microvehículo. Frecuentemente, los microvehículos son perlas porosas suficientemente grandes para permitir que las células emigren y crezcan en el interior de la perla (véase patente U.S. n.º. 5.512.474, expedida a Clapper y otros).

II. *Envolturas*

En procedimientos preferentes, la envoltura es una bolsa de malla estéril construida de una malla de poliéster tejida, de calidad médica. Aunque no se está limitado a materiales de malla fabricados por una compañía concreta, actualmente Tetko, Inc. y Saati fabrican actualmente materiales de malla adecuados para uso con la presente invención.

Obviamente, también se pueden usar otros materiales adecuados (por ejemplo, nailon) y están dentro del ámbito de la presente invención. De hecho, se puede usar cualquier material que sea biocompatible cuando se pone dentro de una herida. Además, la presente invención contempla el uso de una envoltura construida con membranas, incluidas las membranas vendidas por Gelman Sciences y Millipore.

En una realización preferente, las envolturas se montan en un recipiente de tipo bolsa con cuatro bordes y dos superficies. Estos recipientes se pueden hacer de varias maneras. Por ejemplo, la envoltura se puede hacer por soldadura (esto es, uniendo para hacer un cierre) de dos piezas de material (de aproximadamente dimensiones iguales) en tres bordes. El cuarto borde se deja abierto para llenar la bolsa con perlas de colágeno revestidas con queratinocitos.

En una realización alternativa, la envoltura se puede hacer a partir de una sola pieza que primeramente se pliega sobre sí misma. Luego se puede soldar la zona de solapamiento del material, resultando un tubo cilíndrico. Luego se puede hacer una bolsa cerrando por soldadura uno de los extremos del cilindro dejando abierto el otro para llenarlo con células seleccionadas entre fibroblastos, células endoteliales, melanocitos, células de músculo liso, fibroblastos fetales y perlas de colágeno revestidas con células epiteliales; este diseño de la bolsa tiene la ventaja de requerir una soldadura menos.

La presente invención no está limitada a envolturas montadas como bolsas de cuatro bordes ni está limitada a las técnicas descritas antes para hacer las envolturas. Por ejemplo, con la presente invención se pueden usar también envolturas trapecoidales o circulares.

Para el montaje de las envolturas, la presente invención contempla el uso de una variedad de técnicas de cierre, incluidas la soldadura por ultrasonidos y la soldadura por calor. La técnica de soldadura por ultrasonidos es bien conocida en la tecnología de fabricación de dispositivos médicos (véase, por ejemplo, patentes U.S. n.ºs. 4.576.715 y 5.269.917).

La presente invención no está limitada a una técnica particular de soldadura/cierre; de hecho, con la presente invención se puede usar cualquier técnica de cierre adecuada, incluidas, aunque no únicamente, las de cierre por ultrasonidos, radiofrecuencia, calor e impulsos.

En aquellas realizaciones que comprenden el cierre de una malla, la presente invención no está limitada por el tamaño de poro de la malla. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los poros extremadamente pequeños pueden retardar o excluir el movimiento de materiales fuera de la envoltura. El intervalo preferido de tamaños de poro es de 10 micrómetros a 300 micrómetros. Análogamente, si se usa una membrana, la membrana debe ser permeable en una cuantía tal que permita que factores celulares crucen la membrana hacia la herida.

En realizaciones preferentes, las envolturas que contienen el soporte sólido de la presente invención están configuradas como bolsas de té (véase la Figura). Esto es, un extremo de un brabante (3) (por ejemplo, un material biocompatible de nailon) o el sobrante de un cierre hecho por calor) está unido a la envoltura (1) que aloja el soporte sólido (4), mientras que el otro extremo del brabante está unido a un agarradero (2). El agarradero 2 se usa como un "asa" para ayudar a la colocación de la envoltura que contiene el soporte sólido dentro de la herida y a sacarla de ella. La presente invención no está limitada por el material usado para construir el agarradero; en realizaciones preferentes, el agarradero (2) comprende un material de poliéster de calidad médica. Hablando en términos generales, el agarradero (2) está adherido a la piel del paciente en un punto fuera de la herida. El soporte sólido (4) tiene células unidas; se prefiere que tales células sean viables.

III. *Transferencia de factores celulares*

Después de haber colocado la envoltura dentro de la herida, los factores celulares (por ejemplo, los factores de crecimiento del tipo del factor de crecimiento epidérmico, citoquinas, PGDF, factor del tipo de insulina, TGF-beta, citoquina de factor de crecimiento de queratinocitos, TNF, quimioquinas, péptidos quimiotácticos, inhibidores de tejido de metaloproteinasas, etc) excretados de células seleccionadas entre fibroblastos, células endoteliales, melanocitos, células de músculo liso, fibroblastos fetales y células epiteliales se hacen pasar a través de la envoltura a la herida. Los inventores de la presente invención han encontrado que no es necesario que las células seleccionadas entre fibroblastos, células endoteliales, melanocitos, células de músculo liso, fibroblastos fetales y células epiteliales estén en contacto directo con la herida. Si bien es evidente que no es necesario comprender por qué es suficiente tal contacto indirecto para la curación de la herida con el fin de llevar a la práctica la presente invención, se cree que lo queratinocitos del donante (esto es, los contenidos dentro de la envoltura) crean un medio favorable para el crecimiento de las células seleccionadas entre fibroblastos, células endoteliales, melanocitos, células de músculos lisos, fibroblastos fetales y células epiteliales presentes en la herida del sujeto.

Los inventores han encontrado que el uso de la presente invención junto con materiales de apósito estándar no afecta perjudicialmente a la capacidad de modificar el medio de la herida.

Parte experimental

Los ejemplos siguientes sirven para ilustrar ciertos procedimientos y aspectos de la presente invención.

En la descripción experimental que sigue, se aplican las abreviaturas siguientes: M (molar); mM (milimolar); μ M (micromolar); g (gramos); mg (miligramos); μ g (microgramos); kg (kilogramos); l (litros); ml (mililitros); dl (decilitros), μ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros); nm (nanómetros); h y hr (horas); min (minutos); s y seg (segundos); FDA (United States Food and Drug Administration); AET, Inc. (Middletown, DE); Abbott (Abbott Laboratories, Chicago, IL); American Electric Co., (Santa Fe Springs, CA); Collaborative Biomedical Products (Bedford, MA); Gelman Sciences (Ann Arbor, MI); ICN (ICN Biomedicals, Inc., Costa Mesa, CA); Jackson Labs (Bar Harbor, ME); Labcorp (Canandaigua, NY); Labine (Melrose Park, IL); Mallinckrodt Veterinary (St. Louis, MO); Millipore (Millipore, MA); Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia); Richard-Allen, Inc., (Richland, MD); Saati (Stamford, CT); Signa (St. Louis, MO); Tetko, Inc (Depew, NY); 3M Healthcare (St. Paul, MN) y Thunderware (Orinda, CA).

Ejemplo de referencia 1

Los experimentos de este ejemplo demuestran que los queratinocitos humanos de cultivo crecidos sobre microvehículos macroporosos y contenidos en una envoltura porosa mejoran la curación de heridas hechas quirúrgicamente en ratones

A. *Metodología experimental*

Preparación de queratinocitos humanos

Aislamiento y crecimiento de queratinocitos humanos: Se aislaron queratinocitos humanos (certificado AATB; programa de queratinocitos cultivados de la Universidad de Michigan) en la unidad de quemaduras/trauma de la Universidad de Michigan a partir de piel del espesor de la escisión.

La tripsinización de la piel se efectuó como sigue. La piel se puso con la cara de la dermis hacia abajo en discos Petri de 150 mm. Las piezas se cortaron en piezas menores (aproximadamente 2 cm x aproximadamente 0,3 cm) y se mantuvieron en remojo en solución tampón estéril de HEPES 30 mM, glucosa 10 mM, KCl 3 mM, NaCl 130 mM, Na_2HPO_4 1 mM (pH 7,4) que contenía 50 unidades de penicilina y 50 μ g de estreptomina (Sigma, P-0906). Después de mantener en remojo durante 1-2 h a 4°C, se eliminó el tampón por aspiración y se añadió 0,09% de tripsina (Sigma, tipo IX) en tampón de penicilina y estreptomina a los pocillos que contenían el tejido de la piel.

Después de tripsinizar durante la noche a temperatura ambiente, se eliminó por aspiración la solución de enzimas y a las piezas de piel se añadió medio MCDB 153 (Gibco, Grand Island, NY) completo que contenía inhibidor de tripsina. El medio MCDB 153 completo se preparó suplementando MCDB 153 (Gibco, Grand Island, NY), preparado como describen Boyce y Ham [*Normal human epidermal keratinocytes*, en *In vitro Models for Cancer Research* (Weber y Sekely, editores) CRC Press, Boca Raton, FL, págs. 245-274 (1985)], con hidrocortisona 0,6 μ M (0,218 μ g/ml), 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 5 μ g/l de insulina, 6% de extracto pituitario bovino y CaCl_2 0,15 mM.

Se separó la dermis de la epidermis y las células epidérmicas basales se separaron de ambos segmentos de la piel rascando suavemente. La suspensión de células se recogió en tubos de centrifugación cónicos de 50 ml, se centrifugaron suavemente a temperatura ambiente y las células se pusieron en suspensión nuevamente en 50 ml de medio completo más 2% de suero quelatado.

ES 2 292 034 T3

Las células se sometieron a recuento usando un hemacitómetro y 20×10^6 células se cultivaron en matraces T-75 Corning Plastic y se hicieron crecer a 37°C en atmósfera con 5% de CO_2 en una incubadora humidificada. Después de 3 días, se eliminó el medio de crecimiento usado y se añadió MCDB 153 completo sin suero. Las células se alimentaron cada día.

5

Las células subcultivaron durante la fase log. de crecimiento. Después, se tripsinizaron las células usando 0,025% de tripsina (tipo IX) más 0,01% de EDTA en el tampón de HEPES. Las monocapas se lavaron dos veces con el tampón y luego se añadieron 2-3 ml de solución de enzimas recientemente preparada (o una parte alícuota congelada). Después de 1 min, a 37°C , se aspiró suavemente la solución de enzima y las células se pusieron en matraces a 37°C durante 2-3 min hasta que las células se separaron del fondo con una ligera vibración del matraz. El medio se neutralizó con 1-3 ml de MCDB 153 más 0,03% de inhibidor de tripsina (Sigma). Se contaron las células, se centrifugaron y cultivaron $0,5 \times 10^6$ células por matraz. Las células se subcultivaron 3-4 veces.

10

Lavado de perlas CYTOLINE I^{MC} Se mantuvieron en autoclave durante 10 min 5 g de células de microvehículo macroporosas CYTOLINE^{MC} (Pharmacia Biotech) en 40 ml de agua MilliQ (Millipore, Bedford, MA) en un matraz erlenmeyer de 125 ml. Después de los procesos de autoclave, se enfriaron las perlas y se aspiró el agua. Las perlas se pusieron en suspensión en 40 ml de agua Milli Q y luego se agitaron a velocidad moderada en una mesa de agitación orbital Labline durante 10 min. Se aspiró nuevamente el agua y se realizó un lavado final con 40 ml de agua Milli Q.

15

20

Las perlas se pasaron a un tubo cónico de cultivo de 50 ml, se aspiró el agua y se añadieron 30 ml de NaOH 1 N. Se incubaron las perlas a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó de las perlas la solución de NaOH por aspiración y las perlas volvieron a ponerse en suspensión en 50 ml de agua Milli Q. La parte alícuota se pasó a un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se sacudió a velocidad moderada durante 10 min. Se eliminó de las perlas por aspiración el agua Milli Q y se volvió a poner en suspensión las células en agua Milli Q; este proceso de aspiración/suspensión se repitió un total de 5 veces. El pH era neutro (esto es, inferior a 8) medido con papel de pH.

25

Se eliminó por aspiración en agua de las perlas y éstas volvieron a ponerse en suspensión en 40 ml de PBS sin Mg^{2+} ni Cu^{2+} , y se mantuvieron en autoclave a 121°C durante 30 min.

30

Crecimiento de queratinocitos en perlas de CYTOLINE I^{MC}: Se sometió a tratamiento en autoclave como se ha descrito antes una suspensión que contenía 10 ml de solución de PBS y 5 g de perlas (contenida en un tubo de centrifugadora cónico, estéril, de 50 ml). Se decantó la solución y se añadieron a las perlas 50 ml de medio MCDB 153 completo. Las células se acondicionaron en el medio a 37°C con gas de CO_2 al 5% durante 48 horas.

35

Se decantó el medio y las perlas se pasaron a un tubo de centrifugadora separado de 50 ml. Se añadieron 10-15 ml del medio y la suspensión se centrifugó a 1000 rpm durante 3 min. Se decantó el medio y se añadieron 30×10^6 células de mama (de un subcultivo 1 de donante vivo, nunca congeladas). Después de una agitación suave de las células con las perlas durante 5 min, las células y las perlas se vertieron en una botella rodillo de vidrio de 250 ml y se añadieron 50 ml del medio; esto se realizó usando un sistema de crecimiento con agitación y fermentador.

40

Como ensayo de toxicidad, se eliminaron de la botella rodillo de vidrio 5 ml de células y perlas y se hicieron crecer en un matraz T-4 para determinar el crecimiento de las células en el fondo de plástico de la botella en presencia de las perlas. La botella rodillo se incubó durante la noche a 37°C y seguidamente se añadieron a la botella rodillo 100 ml adicionales del medio y se inició la rotación de la botella (velocidad de rotación = una vuelta/15 s).

45

Para alimentar las células se eliminó una parte alícuota del medio y se reemplazó con medio fresco ajustado al pH correcto por paso de CO_2 gas. Las células se alimentaron cada 48 horas.

50

Diseño experimental

Se hizo un ensayo de animales durante 8 días con dos grupos de 10 animales cada uno. Los apósitos de las heridas (véase más adelante) se cambiaron cada día aparte del día 0 de inicio. Las mediciones de la superficie de la herida y las fotografías se obtuvieron los días 0, 2, 4, 6 y 8.

55

Todos los procesos quirúrgicos se realizaron en condiciones estériles dentro de una cámara de flujo laminar. Se usaron ratones hembra Un/J de 5 semanas (Jackson Labs). Los ratones Un/J contienen una mutación recesiva hallada en el cromosoma 11 y son atímicos (deficientes en células T). Los ratones tienen un número reducido de linfocitos constituido casi enteramente por células B, una respuesta de IgM normal a antígenos timodependientes, una respuesta pobre a antígenos del timo, macrófagos y actividad intensificada de macrófagos y células de NK y una respuesta intensificada a la infección. Los ratones Un/J no rechazan injertos de piel alogénica y xenogénea y tumorales.

60

Los ratones se anestesiaron con metofane (Mallinckrodt Veterinary) y se prepararon con etanol. Usando tijeras quirúrgicas finas, se hizo en los lomos de los ratones una herida quirúrgica de espesor entero de una superficie de aproximadamente 80 mm^2 (la profundidad de la herida se pudo medir a través del *panniculus carnis*, pero la piel del ratón es tan delgada que no se usó aquí como indicador). Los apósitos de la herida (véase más adelante) se aseguraron al extremo cefálico de la herida con una grapa quirúrgica. Luego cada ratón se devolvió a su jaula de biorriesgo.

65

ES 2 292 034 T3

Los días 2, 4, 6 y 8 los animales se llevaron a la cámara de flujo laminar para quitar la grapa y sustituir la bolsa. Los animales estaban ligeramente constreñidos mientras que se hacían las mediciones y se tomaban las fotografías (descrito más adelante). Se reemplazó y aseguró el apósito y todos los cambios de apósito se hicieron usando técnica estéril sin anestesia general.

Apósito para la herida

A las heridas se pusieron apósitos con queratinocitos humanos cultivados (perlas de queratinocitos) en una bolsa DELNET^{MC} (P530 Natural, AET, Inc) o una bolsa DELNET^{MC} sola P530 Natural, AET, Inc.); las bolsas DELNET^{MC} eran aproximadamente cuadradas (aprox. 23 mm x 25 mm). Las costuras de las bolsas se hicieron con una unidad de cierre por impulsos con calor. (American International Electric Co.). Antes de aplicarlas sobre los ratones, las bolsas DELNET^{MC} se esterilizaron con óxido de etileno gas y se pusieron en un envase estéril. Una banda BANDAID^{MC} (3M Healthcare) cubría las bolsas DELNET^{MC} y se aseguró con grapas quirúrgicas (Richard-Allen, Inc.). La bolsa se grapó a la banda y la banda se grapó al ratón.

El montaje de bolsa y perlas se realizó en una cámara de cultivo de tejidos. Dentro de una cámara de flujo laminar, la suspensión de queratinocitos/perlas se pasó a la bolsa de DELNET^{MC} con una pipeta de vidrio. En la bolsa se pusieron aproximadamente 250 μ l de la suspensión de queratinocitos/perlas. Después de haber cargado las perlas en la bolsa, la costura final se hizo con una aguja quirúrgica calentada en un esterilizador de perlas de vidrio. La bolsa DELNET^{MC} que contenía la suspensión de queratinocitos/perlas se denomina "perlas/bolsa" mientras que la bolsa DELNET^{MC} sin las perlas se denomina "bolsa". Las bolsas y las perlas/bolsas se pusieron en medio MCDB 153 completo descrito antes y después se cargaron y sellaron por calor.

Medición de la superficie de la herida

La superficie total de las heridas de ratón se realizó como se ha descrito previamente (Schwarz y otros, Wound Repair and Regeneration 3:204-212 (1995)). En resumen, Se trazó la superficie de la herida sobre una película transparente (Apollo, Ronkonkoma, NY) con un marcador fino. La película transparente se fotocopió sobre papel corriente y posteriormente se examinó por barrido con un escáner manual Lightning Scan Pro 256 (Thunderware) a ficha PIC. La superficie del tejido se calculó con análisis de superficies no rectangulares por registro de imagen NIH 1,58 y los datos se expresaron como mm². La media la desviación estándar se calcularon usando software Statworks (una diferencia estadísticamente significativa era $p < 0,05$).

B. Resultados experimentales

La Tabla 2 presenta la superficie del tejido de la herida (mm²) en la línea de base (día 0) y los días 2, 4, 6 y 8 para cada ratón que recibió bolsas que contenían perlas revestidas con queratinocitos (perlas/bolsas); también se recoge la reducción del tamaño de la herida como porcentaje del tamaño original de la herida para cada ratón. En la Tabla 3 se presentan datos análogos para ratones que recibieron sólo las bolsas.

La Tabla 4 presenta datos acumulativos para (i) ratones con perlas/bolsas y (ii) ratones con sólo bolsas.

TABLA 2

ID	Ratón 1		Ratón 2		Ratón 3		Ratón 4		Ratón 5	
	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor
Día 0	117,02		66,29		89,89		69,9		103,82	
Día 2	92,44	21	90,87	0	63,13	30	51,34	27	180,56	0
Día 4	70,31	40	68,81	0	31,6	65	40,65	42	85,68	17
Día 6	80,87	31	54,21	18	32,73	64	39,24	44	89,76	14
Día 8	50,05	57	37,18	44	26,73	70	31,95	54	58,58	44

ID	Ratón 6		Ratón 7		Ratón 8		Ratón 9		Ratón 10	
	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor
Día 0	61,61		58,81		80,08		78,02		65,5	
Día 2	40,97	34	49,84	15	111,31	0	103,48	0	79,92	0
Día 4	28,5	54	21,11	64	77,31	3	48,44	38	55,03	16
Día 6	23,53	62	15,89	73	61,27	23	41,87	46	60,73	7
Día 8	10,31	83	12,48	79	29,55	63	33,69	57	57,29	13

ES 2 292 034 T3

TABLA 3

ID	Ratón 11		Ratón 12		Ratón 13		Ratón 14		Ratón 15	
	Mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor
Día 0	49,38		87,16		40,29		90,81		55,23	
Día 2	71,23	0	160,23	0	45,3	0	201,13	0	61,55	0
Día 4	51,6	0	78,68	10	33,21	18	156,42	0	52,19	6
Día 6	26,48	47	52,24	40	27,95	31	92,19	0	36,61	34
Día 8	33,84	32	52,4	40	15,19	62	59,15	35	30,61	45

ID	Ratón 16		Ratón 17		Ratón 18		Ratón 19		Ratón 20	
	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor
Día 0	120,42		59,11		128,15		78,29		55,44	
Día 2	90,26	25	151,4	0	151,4	0	114,18	0	89,89	0
Día 4	59,84	50	124,81	0	124,81	0	138,75	0	66,58	0
Día 6	47,11	61	92,94	23	92,94	23	92,39	0	59,6	0
Día 8	26,95	78	90,71	35	78,32	35	65,52	16	38,79	30

TABLA 4

Día 0		Tamaño (mm ²)	
Perlas/bolsas	Media	79,09	
	D. E.	19,2	
Sólo bolsas	Media	75,64	
	D. E.	28,64	

% menor	Día 2		Día 4		Día 6		Día 8	
	Perlas/ bolsas	Sólo bolsas	Perlas/ bolsas	Sólo bolsas	Perlas/ bolsas	Sólo bolsas	Perlas/ bolsas	Sólo bolsas
Media	12,7	2,5	33,9	8,4	38,2	26,6	56,4	37,3
Desviación estándar	14,29	7,9	23,82	15,83	23,06	22,62	20,12	21,78
Significación (<0,05)	p < 0,027		p < 0,008		p < 0,19		p < 0,05	

Como lo indican los datos de las Tablas 2-4, las perlas/bolsas presentaban una diferencia estadísticamente representativa en la curación de heridas (esto es, una reducción en la superficie de las heridas) el día 2 en comparación con las bolsas solas (Véase la Tabla 4, p < 0,027). El día 4, las heridas de ratones tratados con perlas/bolsas (Tabla 2.1) tenían una reducción significativa de la superficie de la herida en comparación con las heridas de ratón con sólo las bolsas (Tabla 3) como lo indica el nivel de significación (p < 0,008) en la Tabla 4. El día 6 no había diferencia significativa de la curación de la herida entre los dos grupos (véase Tabla 3, p < 0,16). Sin embargo, el día 8 había de nuevo una reducción estadísticamente significativa en la superficie de la herida en el grupo de perlas/bolsa (Tabla 2) en comparación con el grupo de sólo bolsa (Tabla 3). (Véase Tala 4, p < 0,05).

Los experimentos de este ejemplo revelan que los queratinocitos humanos cultivados que crecen sobre microvehículos macroporosos (perlas/bolsas) promueven la curación de heridas. El modelo de ratón usado predice que los queratinocitos humanos crecidos sobre microvehículos macroporosos contenidos en bolsas intensificarán la curación de heridas en seres humanos.

Ejemplo de referencia 2

Los experimentos de este ejemplo demuestran que los queratinocitos humanos crecidos sobre microvehículos macroporosos y contenidos en una envoltura macroporosa que se cubre luego con un material de apósito para heridas mejoran la curación de heridas hechas quirúrgicamente en ratones.

ES 2 292 034 T3

A. Metodología experimental

Los experimentos de este ejemplo se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 con las excepciones siguientes. El grupo de ratones que recibió perlas de microvehículo macroporoso CYTOLINE^{MC} (Pharmacia Biotech) (esto es, el grupo de perlas/bolsa) estaba constituido por 5 animales, mientras que el grupo que recibió sólo las bolsas (esto es, el grupo de bolsas solas) estaba constituido por 4 animales. (Están marcados de 2 a 5 porque el Ratón 4 murió durante la anestesia). En este apósito las bolsas del grupo perlas/bolsa y el grupo de bolsas solas se cubrieron con un apósito de película de poliuretano (TEGADERM^{MC}, 3M Health Care, St. Paul, MN) con un producto de celofán.

Más específicamente, los apósitos de las heridas contenían queratinocitos humanos cultivados crecidos sobre perlas (queratinocitos/perlas) en una bolsa DELNET^{MC} (P530 Natural; AET, Inc) o una bolsa DELNET^{MC} sola (P530 Natural; AET, Inc.). Posteriormente las bolsas se cubrieron con un apósito TEGADERM^{MC} que, a su vez, estaba cubierto con una banda BANDAID^{MC} (3M Healthcare). Las bolsas se graparon a los ratones.

B. Resultados experimentales

La Tabla 5 presenta la superficie del tejido de la herida (mm²) en la línea de base (día 0) y los días 2, 4, 6 y 8 para cada ratón que recibió bolsas que contenían perlas revestidas con queratinocitos (perlas/bolsa); también se recoge la reducción del tamaño de la herida como porcentaje del tamaño original de la herida para cada ratón. En la Tabla 6 se presentan los datos análogos para los ratones que recibieron bolsas solas.

La Tabla 7 presenta datos acumulativos para (i) ratones con perlas/bolsa y (ii) ratones con sólo bolsa.

TABLA 5

ID	Ratón 2		Ratón 3		Ratón 4		Ratón 5		Ratón 6	
	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor
Día 0	182,41		132,88		155,53		173,76		164,24	
Día 2	162,43	11	168,57	0	157,02	0	190,51	0	216,66	0
Día 4	136,73	25	122,37	8	96,69	38	164,7	6	136,72	17
Día 6	74,71	59	89,91	33	49,66	68	25	86	25	85
Día 8	13,19	93	10,78	92	4,59	97	18,24	90	27,87	83

TABLA 6

ID	Ratón 7		Ratón 8		Ratón 9		Ratón 10	
	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor	mm ²	% menor
Día 0	134,14		198,31		124,1		229,96	
Día 2	151,4	0	170,21	0	166,42	0	203,36	0
Día 4	206,34	0	204,39	0	160,69	0	193,03	16
Día 6	112,99	22	121,92	39	117,33	5	64,92	22
Día 8	16,88	88	53,45	73	61,36	51	59,3	74

ES 2 292 034 T3

TABLA 7

Día 0		Tamaño		(mm ²)				
Células/bolsas		Media		155,76				
		D. E.		22,47				
Sólo bolsas		Media		171,16				
		D. E.		50,9				
% menor	Día 2		Día 4		Día 6		Día 8	
	Perlas/ bolsas	Sólo perlas	Perlas/ bolsas	Sólo perlas	Perlas/ bolsas	Sólo perlas	Perlas/ Bolsas	Sólo perlas
Media	22	0	18,8	0	66,2	22	91	71,5
Desviación estándar	4,9	0	13,1	0	21,8	13,8	5,1	15,2
Significación <0,05	p < 0,407		p < 0,026		p < 0,010		P < 0,030	

Como lo indican los datos de las Tablas 5-7, las perlas/bolsas demostraron una diferencia estadísticamente significativa en la curación de heridas (esto es, una reducción de la superficie de la herida) el día 4 en comparación con las bolsas solas (véase la Tabla 7, $p < 0,026$). La diferencia estadísticamente significativa en la curación de la herida entre los dos grupos se mantuvo los días 6 y 8 ($p < 0,010$ y $p < 0,030$, respectivamente).

La comparación de los datos de la Tabla 7 con los de la Tabla 1 (Ejemplo 1) indica que los apósitos de heridas sin TEGADERM^{MC} comienzan a contraerse antes que los que tienen TEGADERM^{MC}. Más específicamente, las heridas de los animales con perlas/bolsas tratadas sin TEGADERM^{MC} eran 12% menores el día 2 y 33,9% menores el día 4, mientras que las heridas de los animales con perlas/bolsas tratadas con TEGADERM^{MC} eran 2,2% y 18% menores los mismos días. Sin embargo, el tamaño de las heridas de los animales con perlas/bolsas tratadas con TEGADERM^{MC} eran menores los días 6 y 8 que las de las no tratadas sin TEGADERM^{MC}. Si bien no se requiere entender el mecanismo de este efecto para la práctica de la presente invención, se cree que esto es debido, en parte, a la capacidad de TEGADERM^{MC} de mantener la humedad de las heridas.

Sobre la base de la discusión precedente y los materiales experimentales, está claro que la presente invención proporciona sistemas y procedimientos eficaces y efectivos para la curación de heridas, especialmente la curación de heridas crónicas. Los dispositivos y procedimientos se pueden usar solos o en combinación con otros medios tradicionalmente empleados en la curación de heridas.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema para el tratamiento de heridas que comprende:

- 5 (a) células sobre un soporte sólido, en el que las mencionadas células se seleccionan entre el grupo constituido por fibroblastos, células endoteliales, melanocitos, células de músculos lisos, fibroblastos fetales y células epiteliales; y
- 10 (b) una envoltura que comprende material de malla que tiene poros, envoltura que aloja el mencionado soporte sólido, en el que la mencionada envoltura está sellada para prevenir que el mencionado soporte sólido salga de la mencionada envoltura.

2. El sistema de la reivindicación 1, en el que las mencionadas células son viables.

15 3. El sistema de la reivindicación 1, en el que el mencionado soporte sólido comprende perlas.

4. El sistema de la reivindicación 3, en el que las mencionadas perlas son macroporosas.

20 5. El sistema de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las mencionadas células crecen sobre las mencionadas perlas.

6. El sistema de la reivindicación 3, en el que las mencionadas perlas están revestidas con una matriz extracelular.

25 7. El sistema de la reivindicación 6, en el que la mencionada matriz extracelular se selecciona entre el grupo constituido por Matrigel, Factor de Crecimiento, Matrigel Reducido, colágeno fibrilar, laminina, fibronectina y colágeno.

8. El sistema de la reivindicación 7, en el que el mencionado colágeno es colágeno de tipo IV.

30 9. El sistema de la reivindicación 1, en el que los mencionados poros son lo bastante grandes para permitir que las mencionadas células atraviesen el mencionado material de malla.

10. El sistema de la reivindicación 1, en el que los mencionados poros son demasiado pequeños para permitir que las mencionadas células atraviesen el mencionado material de malla.

35 11. El sistema de la reivindicación 1, en el que los mencionados poros tienen un tamaño que varía de 10 a 300 micrómetros.

12. El sistema de la reivindicación 1, en el que el mencionado material de malla comprende poliéster.

40 13. El sistema de la reivindicación 1, en el que la mencionada envoltura comprende un material biocompatible.

14. El sistema de la reivindicación 1, en el que la mencionada envoltura comprende además un medio para quitar la mencionada envoltura de una herida.

45 15. El sistema de la reivindicación 14, en el que el mencionado medio para quitar la envoltura comprende un bramante fijado a la mencionada envoltura.

50 16. Uso de células sobre un soporte sólido, en el que las mencionadas células se seleccionan entre el grupo constituido por fibroblastos, células endoteliales, melanocitos, células de músculos lisos, fibroblastos fetales y células epiteliales, y en el que las mencionadas células están selladas en una envoltura que comprende un material de malla que tiene poros, por lo que se dispone de una envoltura sellada que contiene células, para la fabricación de un medicamento para tratamiento de heridas.

55 17. El uso de la reivindicación 16, en el que el mencionado soporte sólido comprende perlas.

18. El uso de la reivindicación 17, en el que las mencionadas perlas son macroporosas.

19. El uso de la reivindicación 17, en el que las mencionadas perlas están revestidas con una matriz extracelular.

60 20. El uso de la reivindicación 19, en el que la mencionada matriz extracelular se selecciona entre el grupo constituido por Matrigel, factor de crecimiento, Matrigel Reducido, colágeno fibrilar, laminina, fibronectina y colágeno.

21. El uso de la reivindicación 20, en el que el mencionado colágeno es colágeno de tipo IV.

65 22. El uso de la reivindicación 16, en el que los mencionados poros son lo bastante grandes para permitir que las mencionadas células atraviesen el mencionado material de malla.

ES 2 292 034 T3

23. El uso de la reivindicación 16, en el que los mencionados poros son demasiado pequeños para permitir que las mencionadas células atraviesen el mencionado material de malla.

5 24. El uso de la reivindicación 16, en el que los mencionados poros tienen un tamaño que varía de 10 a 300 micrómetros.

25. El uso de la reivindicación 16, en el que el mencionado material de malla comprende poliéster.

10 26. El uso de la reivindicación 16, en el que el mencionado material de malla comprende una membrana biocompatible.

27. El uso de la reivindicación 16, en el que el medicamento comprende además un apósito para cubrir la mencionada envoltura que contiene células puesta en la mencionada herida.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

