



(11) *Número de Publicação:* PT 641223 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
A61L027/00 A C12N005/00 B
A61K007/48 B

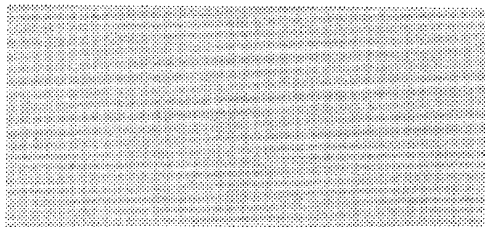
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

| | |
|---|--|
| (22) <i>Data de depósito:</i> 1993.04.23 | (73) <i>Titular(es):</i> NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA - OTTAWA ONTARIO K1A 0R6 CA |
| (30) <i>Prioridade:</i> 1992.05.18 GB 9210574 | |
| (43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1995.03.08 | (72) <i>Inventor(es):</i> DAVID W. ARMSTRONG CA |
| (45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.08.08 | (74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT |

(54) *Epígrafe:* MICROFERAS REVESTIDAS COM CÉLULAS BIOTERAPÉUTICAS

(57) *Resumo:*

MICROFERAS REVESTIDAS COM CÉLULAS BIOTERAPÉUTICAS



DESCRIÇÃO

"MICROSFERAS REVESTIDAS COM CÉLULAS BIOTERAPÊUTICAS"

ÁREA TÉCNICA

A presente invenção relaciona-se com o campo dos implantes de tecidos e mais particularmente com a aplicação de implantes de pele para o tratamento de lesões da pele com espessura profunda ou semi-profunda, tais como queimaduras e outras feridas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

As lesões da pele com espessura profunda ou semi-profunda tais como queimaduras e outras feridas, representam um custo significativo para os sistemas de cuidados de saúde. Por exemplo, na América do Norte anualmente cerca de 2 milhões de pessoas sofrem queimaduras. Destas cerca de 200.000 pessoas são hospitalizadas, das quais 15.000 morrem de causas relacionadas com queimaduras. Os custos hospitalares globais para o tratamento destes doentes é da ordem dos \$1.000/percentagem de área queimada (\$U.S., 1992) pelo que o doente queimado médio com queimaduras em 20 a 30% do seu corpo gera custos com cuidados hospitalares iniciais de cerca de \$25.000, não incluindo o tratamento posterior e a perda potencial de produtividade e rendimentos. Por exemplo, MaMillan et al. (*J. Burn Care Rehab.* 6:444-446; 1985) demonstraram que os custos da sala de operações aumentam logaritmicamente com a percentagem de superfície corporal queimada. Claramente, existe uma necessidade de avanços na tecnologia para mitigar estes custos e reduzir o sofrimento dos doentes.

f L A

A pele consiste numa camada de derme que está subjacente a uma camada de epiderme. A camada de derme consiste sobretudo em fibroblastos e tem cerca de cinco vezes a espessura da camada de epiderme. A camada de epiderme da pele intacta, consistindo sobretudo em queratocitos e células imunitárias tais como células de Langerhans dendríticas, normalmente impede a perda de água e a invasão microbiana, pelo que as lesões da pele com espessura profunda ou semi-profunda podem constituir risco de vida. A rapidez de fecho de feridas para evitar a fuga de fluidos corporais essenciais e invasão por bactérias é portanto um factor vital na recuperação do doente. Em conformidade foi desenvolvida uma grande variedade de coberturas para feridas para acelerar o fecho de feridas.

Um tratamento existente para queimaduras e feridas inclui a utilização da pele do próprio doente, ou de tecido proveniente de cadáveres ou de porcos para enxerto na ferida do doente. As técnicas tradicionais de enxerto de pele proveniente do doente (autoenxertos) são geralmente muito dolorosas para o doente que já está a sofrer de queimaduras ou de outra ferida. Um autoenxerto compreende uma espessura substancial das camadas da epiderme e derme da pele retirada de outro local do corpo. Na tentativa de limitar a quantidade de pele retirada e consequentemente limitar o tamanho da nova ferida, o autoenxerto é tratado para formar um esquema em rede através da lesão da pele. Contudo, o esquema em rede na camada da derme do autoenxerto é subsequentemente cheio com tecido de cicatrização permanente *in vivo*. Estas cicatrizes são frequentemente muito grandes e podem ser gravemente desfigurantes ou, dependendo da sua localização, podem provocar disfunções. Além disso, o doente pode não ter área não-queimada suficiente para recuperação de um enxerto suficientemente grande para transplante para outro local do corpo.

Têm sido utilizados os enxertos de pele provenientes de cadáveres (aloenxertos) ou fontes porcinas (xenoenxertos) num

esforço para reduzir o sofrimento do doente e encorajar a cicatrização das feridas. Uma desvantagem principal do aloenxerto é a possibilidade de transmissão de doenças (por exemplo, HIV, hepatite B). Além disso, a camada de epiderme apresenta antigenicidade acentuada pelo que os enxertos, incluindo os aloenxertos, não directamente provenientes do doente são normalmente rejeitados duas semanas após o implante. Embora o xenoenxerto proporcione um enxerto quando há insuficiência de tecido de dador humano, é rejeitado ainda mais rapidamente do que o aloenxerto e tem de ser removido no terceiro dia após a aplicação antes que seque e forme escaras e antes que a adesão forte à ferida requeira excisão cirúrgica.

Todos estes enxertos de pele, nomeadamente o autoenxerto, o aloenxerto, e o xenoenxerto, são normalmente muito finos e frágeis, tornando o seu transporte e manuseamento extremamente difíceis. Além disso, os enxertos são fixos ao local da ferida por vezes com suturação extensa e/ou agramos aumentando significativamente o desconforto do doente. Adicionalmente, os doentes gravemente queimados ou feridos estão já comprometidos tornando assim os procedimentos cirúrgicos com anestesia ainda mais difíceis e possivelmente envolvendo risco de vida.

Em desenvolvimentos mais recentes, por exemplo a Patente U.S. Número 4.996.154 (publicada em 26 de Fevereiro de 1991, de Millipore Corp., E.U.A.) e Beumar, G. J. *et al.* ("Biocompatibility and Characterization of a Polymeric Cell-Seeded Skin Substitute", 17th Ann. Meeting Soc. for Biomaterials; 1-5 de Maio, 1991, Scottsdale, Arizona, E.U.A., p. 263), as células da pele foram inoculadas em folhas de tipo rede para constituir um implante de tecido. As folhas são suturadas ou agramadas no local sobre a área da ferida e o material de suporte é eventualmente reabsorvido pelo organismo. Existem algumas indicações provenientes de estudos preliminares de que o grau de desenvolvimento de tecido cicatricial pode ser reduzido

f l A

por esta abordagem. Além disso, o segmento de matriz de rede é mais estável do que um enxerto de pele.

Contudo, existem vários problemas com as películas ou folhas celulares planares de pele regenerada. Os segmentos de pele de matriz de rede são tipicamente fornecidos em dimensões de cerca de 10 cm de largura por 10 cm de comprimento e apenas com a espessura de algumas camadas de células. Será entendido pelos especialistas na matéria que os locais queimados são frequentemente maiores e raramente de espessura uniforme ou estrutura planar. Os segmentos não contemplam adequadamente as variações de contorno na pele pelo que na maior partes dos casos existirão ainda problema de desfiguramento em maior ou menor grau. Embora sejam mais estáveis do que os enxertos, os segmentos finos são ainda muito frágeis e em muitos casos as folhas finas são reforçadas com gaze impregnada com vaselina para procedimentos cirúrgicos. Adicionalmente, os pequenos pedaços de pele têm ainda de ser suturados e/ou agrafados uns aos outros e ao corpo resultando num prolongamento do procedimento cirúrgico num doente já fraco e comprometido.

Além disso os segmentos de pele aplicados podem ter características de transferência de gases/massa muito fracas conduzindo ao potencial de necrose dos tecidos devido à falta de nutrientes que chegam às células. Isto, por sua vez, pode conduzir à vesiculação do segmento. A transferência de gases/massa pode ser afectada mais adversamente por uma camada residual de vaselina no local uma vez retirada a gaze após o procedimento cirúrgico. A camada residual de vaselina pode mesmo conduzir à partição de vários factores, tais como factores de crescimento, para esta camada onde não estariam disponíveis para subsequente actuação nas células.

Outra desvantagem reside na própria cultura de células derivadas da pele *in vitro*. Tipicamente estas células dependentes de fixação são cultivadas em condições estáticas num

f l A

frasco de cultura de tecidos contendo a matriz de rede em volumes relativamente pequenos de um meio de cultura para que possa ser efectuada a transferência de gases passiva da superfície do meio para as células no fundo do frasco. O empobrecimento de nutrientes do meio é uma preocupação principal que pode ser combinada com a formação de um microambiente imediatamente adjacente às células. Esse microambiente é ainda mais empobrecido em nutrientes e tende a ter uma concentração superior de subprodutos metabólicos que podem afectar de modo adverso o crescimento das células. Para ultrapassar estes problemas, são necessários numerosos passos trabalhosos para mudar o meio, aumentando em cada passo a possibilidade de contaminação microbiana.

Num esforço para aumentar a transferência de gases/massa, foi desenvolvido (Marrow-Tech Inc., E.U.A.) um sistema de cultura constituído por um saco permeável a gases com uma bomba de recirculação para movimentar o meio através da superfície da cultura em crescimento para um tecido de rede nela contido. As células são tipicamente inoculadas aleatoriamente na rede criando assim "multi-núcleos" de crescimento celular. Contudo, quaisquer células que não estejam firmemente fixas à superfície provavelmente circularão através da bomba e sofrerão cisalhamento e outros efeitos de dilaceração. O sistema ainda é de trabalho intensivo e incómodo conduzindo a uma probabilidade acrescida de contaminação devido aos requisitos de manuseamento excessivos. Embora o sistema não seja estático, o ambiente não é totalmente homogéneo e as células fixas à rede não têm uma fase de crescimento uniforme devido às condições de cultura semi-estáticas e à inoculação aleatória das células na rede. Não só existe um problema de homogeneidade ao longo de um dado segmento, mas existe também um problema de homogeneidade de segmento para segmento ao longo da área frequentemente extensa da lesão da pele. Além disso, a área efectiva de células viáveis pode ser significativamente reduzida por suturação e/ou

f L A

aplicação de agrafos nas bordas do segmento que pode destruir ou perturbar a proliferação das células.

Nenhuma das técnicas do estado da técnica contempla as variações de contorno da lesão da pele. Uma lesão da pele raramente teria uma forma "perfeita" para aceitar estes enxertos e segmentos planares, resultando na ocorrência provável de áreas de não-contato em que a pele nova não se estabelece completamente. Todos estes implantes requerem aplicação de agrafos e/ou suturação aumentando assim a probabilidade de formação de mais cicatrizes.

Além disso, muitos destes desenvolvimentos não resolvem a necessidade crítica de estabelecimento de uma camada de epiderme. O vapor de água passa através da pele normal a uma taxa de cerca de 8,5 g/m² por hora e de locais sem uma camada de epiderme a uma taxa de cerca de 150 g/m² por hora. Idealmente, a permeabilidade de um implante de pele deve ser próxima da da pele normal para impedir o tecido de secar e de trombose quando a permeabilidade é excessivamente elevada e de acumulação de líquido e baixa aderência do enxerto a baixa permeabilidade.

Demetriou, A. A. ("Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes", *Science* **233**:1190-1192; 12 de Setembro de 1986) descreve a ligação de hepatocitos a microtransportadores de dextrano reticulado revestido com colagénio para implantação subsequente na cavidade peritoneal de ratos. Os microtransportadores são utilizados para proporcionar uma superfície de fixação para que os hepatocitos sobrevivam e funcionem *in vivo*. Os microtransportadores não se destinam a ser reabsorvidos ou a sofrerem degradação uma vez implantados.

O Pedido Internacional Número PCT/US90/02257 (Vacanti *et al.*, publicado em 1 de Novembro de 1990, WO 90/12604) relaciona-se com um implante de grandes volumes de células em matrizes

f l A

poliméricas. A matriz é um material em folha fibroso biocompatível degradável ou não-degradável tendo um espaçamento intersticial de 100-200 μm . Vacanti et al. descrevem a fixação e o crescimento de hepatocitos na matriz para implante subsequente no mesentério do intestino delgado.

O Pedido de Patente Europeia N° 242305 relaciona-se com colagénio humano de tipo I ou III que é tratado com ácido e pepsina. O gel de colagénio pode ser formado em películas, folhas ou pérolas. O EP 242305 contempla a utilização de colagénio formado em películas ou folhas como uma base para um enxerto de pele e colagénio formado em pérolas como um substrato para a cultura de células em suspensão.

O Pedido de Patente Internacional N° WO 89/03228 descreve um sistema de enxerto de epiderme em que as células da epiderme são depositadas em camada numa folha de material flexível, revestido com colagénio tal como uma compressa cirúrgica sintética. A compressa cirúrgica é previamente cortada num formato para se adaptar a uma dada ferida. As células são cultivadas num frasco de cultura de tecidos e subsequentemente tripsinizadas para deposição em camada na compressa cirúrgica. O enxerto é então invertido no sítio da lesão da pele, com o lado das células para baixo. Eventualmente, a compressa solta-se parcialmente e é então completamente retirada.

A EP 333328 relaciona-se com aplicações clínicas de células amnióticas que podem ser utilizadas directamente, ou após aplicação num material intermediário, por exemplo, uma prótese, ou um veículo biologicamente aceitável, tal como pérolas de Sepharose, para o tratamento da pele envelhecida.

Um objecto da presente invenção é proporcionar um substituto da pele viva para o tratamento de lesões da pele com espessura profunda ou semi-profunda, tais como queimaduras e outras feridas, que pode acomodar variações de contorno. É um

objecto adicional da presente invenção proporcionar um implante com uma camada de derme e uma epiderme funcional que não necessita da utilização de agafos, suturas, ou outros métodos de fixação.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

De acordo com um aspecto da presente invenção é proporcionado uma composição para substituição de pele viva para lesões da pele com espessura profunda ou semi-profunda que se adapta à forma das lesões, caracterizada por a composição compreender uma suspensão de um veículo líquido biologicamente aceitável, microsferas, compreendendo as microsferas um material que é biocompatível e reabsorvível *in vivo*, tendo as microsferas uma macroporosidade de 30 até 80%, e células da pele proliferativas seleccionadas do grupo que consiste em queratinocitos, fibroblastos da derme, melanocitos e suas combinações que revestem as microesferas.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Nos desenhos que ilustram formas de realização da presente invenção,

a Figura 1 é uma fotomicrografia que mostra fibroblastos da derme fixados a microsferas 1 hora após a inoculação das células;

a Figura 2 é uma fotomicrografia que mostra fibroblastos da derme fixados a microsferas da Figura 1 às 22 horas após a inoculação das células;

a Figura 3A é uma representação esquemática de uma lesão da pele com espessura profunda;

f l A

a Figura 3B é uma representação esquemática da lesão da pele com espessura profunda da Figura 3A implantada com um substituto de pele viva da presente invenção;

a Figura 4 é uma fotomicrografia de queratinocitos fixados a microsferas às 24 horas após a inoculação das células;

a Figura 5 é uma fotomicrografia de queratinocitos fixados a microsferas às 24 horas após a inoculação das células. As microsferas foram incubadas em meio de cultura durante 24 horas antes da inoculação das células;

a Figura 6 é um histograma de dados obtidos num citofluorómetro;

a Figura 7 é uma fotomicrografia que mostra fibroblastos da derme fixados a microsferas tratadas com um factor de fixação 1 hora após a inoculação das células;

a Figura 8 é uma fotomicrografia que mostra fibroblastos da derme fixados a microsferas tratadas com um factor de fixação da Figura 7 às 22 horas após a inoculação das células;

a Figura 9 é uma fotomicrografia de fibroblastos da derme fixados a uma superfície de vidro (controlo);

a Figura 10 é uma fotomicrografia de fibroblastos da derme fixados a uma superfície planar de PHB-PHV (copolímero de polihidroxibutirato-polihidroxivalerato); e

a Figura 11 é uma fotomicrografia de fibroblastos da derme fixados a uma superfície planar de PHB-PHV tratada com um factor de fixação.

MELHOR FORMA DE REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

De acordo com a presente invenção, são fixadas células a microsferas para implantação subsequente *in vivo*. Em particular, é utilizada uma suspensão de microsferas revestidas com células da pele como um substituto da pele viva para lesões da pele com espessura profunda ou semi-profunda. A suspensão de microsferas revestidas com células é aplicada directamente na lesão da pele praticamente do mesmo modo que uma pomada ou uma pasta.

As células da pele podem ser provenientes de um explante de tecido relativamente pequeno de um doente. Alternativamente, os fibroblastos da derme, que apresentam baixa alergenicidade em transplantes, podem ser originários de um dador, incluindo um cadáver. A camada de epiderme apresenta antigenicidade acentuada pelo que normalmente é necessário que os implantes desta camada provenham directamente do doente. Contudo, os estudos indicam que as células de Langerhans são em grande parte responsáveis pela antigenicidade da camada de epiderme (Bagot, M. *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* **71**:128; 1988). É portanto possível que uma cultura pura de queratinocitos possa provir de um dador e que a sua rejeição possa ser mínima ou inexistente.

De acordo com a presente invenção, um pequeno explante de tecido, tipicamente 4 cm², é obtido do doente ou dador utilizando um dermatomo ou outro instrumento cirúrgico adequado. O explante poderia incluir só a camada de epiderme ou uma combinação das camadas de epiderme e de derme. O tecido é então dissociado utilizando enzimas e técnicas de processamento convencionais e inoculado em frascos de cultura de tecidos para expansão celular subsequente dos fibroblastos e/ou dos queratinocitos. As células das camadas de derme e de epiderme podem ser separadas com enzimas tais como dispase ou por imersão em meio de cultura ou soro fisiológico tamponado com fosfato ou por outras técnicas bem estabelecidas. Será entendido pelos especialistas na matéria que pode ser criado um "banco" de

f l A

células da pele, provenientes de dadores, incluindo as provenientes de cadáveres, para pronto tratamento de lesões da pele.

As microsferas têm um diâmetro na gama de cerca de 50 até 500 μm , e preferencialmente na gama de cerca de 80 até 250 μm . As microsferas podem ser feitas de uma variedade de materiais tal como será aqui discutido adiante em mais pormenor. A consideração importante na escolha das microsferas é que o seu material tem de ser biocompatível e deve ser capaz de ser reabsorvido pelo organismo sem a formação de subprodutos tóxicos. Um material adequado é polihidroxibutirato (PHB) que é convencionalmente utilizado para materiais de sutura e agrafos cirúrgicos reabsorvíveis. O PHB é reabsorvido *in vivo* sendo os produtos finais dióxido de carbono e água. Outros materiais adequados são polímeros de lactido-glicolido que estão disponíveis comercialmente para utilização em sistemas de administração de fármacos (Medisorb Technologies International, E.U.A.). Os polímeros são absorvidos por hidrólise aleatória das ligações éster e são degradadas a ácidos láctico e glicólico, que são subprodutos metabólicos normais.

Numa forma de realização da presente invenção, os fibroblastos da derme isolados de um explante de tecido proveniente de um doente ou de um dador são cultivados num frasco de cultura de tecidos até ser produzido um número suficiente de células. Tipicamente, pretende-se ter um número suficiente de células para proporcionar uma densidade de células viáveis no biorreactor de cerca de ou pelo menos de 10^4 até 10^5 células/mL. Numa carga de microsferas típicas de 3 até 5 mg/L com aproximadamente 5×10^6 microsferas/g de peso seco esta densidade de células corresponde a aproximadamente 5 células/microsfera.

Uma vez produzido um número suficiente de células, as células são destacadas do fundo do frasco de cultura de tecidos

f L A

utilizando, por exemplo, tripsina. Será entendido pelos especialistas na matéria que pode ser necessário um número de passagens em frascos de cultura de tecidos de diferentes tamanhos para conseguir o número de células desejado. As células são então inoculadas num biorreactor contendo um meio de cultura de células adequado e microsferas a uma densidade de 1 até 25 g/L com um nível óptimo entre 2 e 5 g/L. As microsferas podem ser adicionadas ao meio de cultura imediatamente antes da inoculação das células ou as microsferas podem ser pré-tratadas por imersão no meio durante um período de tempo antes da inoculação das células. Deixa-se então que as células se fixem às microsferas em condições estáticas ou semi-estáticas durante um período de tempo determinado, por exemplo 3 até 6 horas.

O passo de fixação pode ser realizado num volume reduzido de meio com agitação intermitente durante alguns minutos a cada meia hora durante aproximadamente 3 até 6 horas. A Figura 1 é uma fotomicrografia que mostra fibroblastos da derme provenientes de prepúcio neo-natal fixados a microsferas de PHB-PHV (copolímero de polihidroxibutirato-polihidroxivalerato) 1 hora após a inoculação das células. Os fibroblastos da derme começam a fixar-se às microsferas.

Após um período de tempo para permitir que mais células se fixem às microsferas, adiciona-se então o restante meio para proporcionar o volume de trabalho desejado daí em diante com agitação contínua das microsferas revestidas com células. A Figura 2 é uma fotomicrografia que mostra os fibroblastos da derme fixados às microsferas de PHB-PHV da Figura 1 às 22 horas após a inoculação das células. A maioria dos fibroblastos da derme que se fixaram às microsferas tornaram-se achatados e já não são esféricos.

Alternativamente, as células dissociadas do explante de tecido podem ser inoculadas directamente no biorreactor. Por exemplo, um explante de tecido com 4 cm² produz cerca de 2-5 x

f L A

10^7 células o que é suficiente para proporcionar uma densidade de inóculo entre 3 e 5 células/microsfera em 1 L de meio.

As células fibroblastos da derme, fixadas às microsferas, são então cultivadas em cultura em suspensão num biorreactor, que pode convenientemente ter um volume de trabalho de 250 mL até vários litros. É possível proporcionar um implante de pele substancial com as células cultivadas num biorreactor de 1 L. Com base numa área superficial média de $5000 \text{ cm}^2/\text{g}$ de peso seco de microsferas, uma densidade de microsferas entre 3 e 5 mg/mL proporciona uma área superficial efectiva de cerca de 2 até $2,5 \text{ m}^2$ num reactor com um volume de trabalho de 1 L. As células eventualmente cobrem esta área superficial criando uma camada de pele comparável para migração e proliferação posteriores *in vivo*.

As áreas de queimadura mais pequenas podem ser tratadas com a cultura de um reactor mais pequeno incluindo um frasco de centrífuga de 250 mL. Pode utilizar-se um biorreactor sofisticado, com controlo e monitorização cuidadoso de todos os parâmetros ambientais, por exemplo, tal como descrito na Patente U.S. Número 4.906.577 (Armstrong, Fleming & Grenzowski) publicada em 6 de Março de 1990. Alternativamente, pode utilizar-se um recipiente com simples agitação num incubador de CO_2 . Desde a inoculação inicial das microsferas com células até à colheita final das microsferas revestidas com células do biorreactor, está bem estabelecido na arte o protocolo para manter a esterilidade no reactor.

Ao contrário das técnicas estáticas ou semi-estáticas de cultura de células, tal como praticadas para os segmentos de matriz de rede discutidas anteriormente, a cultura de células em suspensão num biorreactor proporciona uma maior produtividade unitária. Isto foi provado por desenvolvimentos em cultura em suspensão de células fixas a microtransportadores, que são pequenas pérolas com um diâmetro na gama de 100 até $200 \mu\text{m}$ com

f l A

uma área superficial de cerca de $5000 \text{ cm}^2/\text{g}$, e são tipicamente feitas de dextrano reticulado. Certas linhas celulares foram cultivadas em microtransportadores para aumentar a produtividade unitária do crescimento celular e/ou a formação de produto em relação à que é conseguida em cultura estática em frascos de cultura de tecidos (van Wezel, A. L. "Growth of Cell-Strains and Primary Cells in Micro-carriers in Homogeneous Culture" *Nature* **216**:64-65, 7 de Outubro, 1967).

As culturas estáticas para a produção de enxertos da pele em folhas de rede de suporte, em recipientes para cultura de tecidos, têm uma proporção efectiva superfície/volume (S/V) de cerca de $2-5 \text{ cm}^{-1}$ em comparação com uma S/V de cerca de 150 cm^{-1} para microsferas suspensas a uma concentração de 25 g/L . Além disso, a cultura em suspensão é menos trabalhosa e a cultura é homogénea pelo que os problemas de transferência de gases, empobrecimento de nutrientes, e acumulação de nutrientes não são tão restritivos. Por exemplo, para a produção de 2 m^2 de tecido novo utilizando a matriz de rede, seriam necessários aproximadamente 250 frascos de cultura de tecidos, com base numa área superficial tipicamente disponível de 80 cm^2 por frasco.

Preferencialmente, as células fibroblastos da derme são cultivadas num biorreactor até atingirem um estado à confluência ou próximo da confluência, altura em que as células revestem substancialmente a microsfere. A confluência é tipicamente atingida em cerca de 7 dias. Contudo é possível utilizar terapeuticamente as microsferas revestidas com células antes deste período numa altura próxima da confluência quando a população celular está ainda num estado altamente migratório e proliferativo. As células são então concentradas por remoção do excesso de meio de cultura e lavadas *in situ* com um tampão ou solução apropriada para formar uma suspensão de microsferas/células. Contrariamente à prática normal de cultura com microtransportadores que utiliza então um agente tal como tripsina para retirar as células dos microtransportadores, na

f l A

presente invenção, as células fibroblastos da derme não são removidas das microesferas. A suspensão de microsferas/células é então aplicada directamente na ferida praticamente do mesmo modo que seria utilizado para aplicar uma pomada ou pasta. Devido à suspensão uniforme das microsferas, cada microsfere tem um número semelhante de células a ela fixadas resultando numa população homogénea para aplicação subsequente na lesão da pele. Além disso, há homogeneidade na fase de crescimento das células através da área da lesão da pele, mesmo no caso de uma área extensa.

Ao contrário do segmento de matriz de rede discutido anteriormente, a presente invenção reduz o número necessário de manipulações das células. Isto, por sua vez, reduz o potencial de danos às próprias células e minimiza as probabilidades de contaminação que conduzem à infecção da ferida.

As células aplicadas numa ferida de acordo com a presente invenção podem ser facilmente administradas a toda a superfície da ferida. Esta é uma vantagem muito importante uma vez que as células cultivadas numa matriz de rede, e até mesmo enxertos de pele proveniente do doente, frequentemente terão muitas áreas de não-contato em que a pele pode não se estabelecer completamente. A consistência da suspensão permite a correção das variações do contorno que podem estar presentes numa ferida. Esta é uma enorme vantagem em relação aos implantes planares do estado da técnica porque, em primeiro lugar, a ferida raramente tem profundidade uniforme com uma base plana uniforme e, em segundo lugar, a ferida pode prolongar-se através de uma área significativa. Por exemplo, será entendido pelos especialistas na matéria que, no tratamento de uma queimadura que se estende pelo comprimento do braço na sua parte interna, há muitas curvas naturais ao longo do seu comprimento. A presente invenção proporciona um implante que pode preencher até a ferida mais profunda para a sua cicatrização eficaz e regeneração de tecidos tridimensional, mais natural, no local da lesão.

f l A

Um exemplo de uma lesão da pele com espessura profunda, irregular 10 está ilustrado na Figura 3A. A lesão da pele 10 estende-se através da epiderme 11 e da derme 12 até ao músculo subjacente 13. Será entendido pelos especialistas na matéria que um enxerto de pele planar não proporcionaria um implante de pele adequado para este tipo de lesão. A Figura 3B é uma representação esquemática da mesma lesão da pele 10 implantada com um substituto de pele viva 20 da presente invenção. O substituto da pele viva 20 proporciona um implante de fibroblastos da derme 21 e queratinocitos 22.

Podem ser aplicadas camadas subsequentes de fibroblastos da derme na ferida sobre a primeira camada de fibroblastos da derme, por exemplo, para corrigir quaisquer variações de contorno adicionais. Também é possível que uma suspensão de fibroblastos da derme/microsféricas proveniente de um dador seja aplicada na ferida seguida por uma aplicação de uma suspensão de fibroblastos da derme/microsféricas proveniente do doente.

A utilização de células à ou próximo da confluência nas microsféricas não só proporciona uma concentração mais elevada de células à lesão da pele como também é aumentada a eficácia das células. As células animais tendem a funcionar melhor se estiverem num microcosmo tal como o que se encontra numa população de células confluentes ou próximas da confluência numa microsférica. Também são conseguidos melhores produção de crescimento e factores de distribuição especialmente com células em contacto próximo umas com as outras devido à regulação intercelular incluindo interacções autócrinas e endócrinas, limitações difusionais menores, etc.

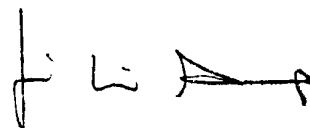
A aplicação da camada de derme permite uma produção rápida da proteína estrutural colagénio e de outros factores de crescimento e fixação. A aplicação precoce de fibroblastos da derme pode minimizar ou impedir a contracção da pele que é a principal causa de formação de cicatrizes e excesso de perda de

f l A

fluidos. Os fibroblastos da derme podem diferenciar-se e alinhar-se de modo axial numa ferida de forma a efectivamente manter a ferida fechada especialmente se a lesão da pele for um corte longitudinal. A aplicação precoce de microsferas revestidas com fibroblastos leva a uma melhor cicatrização da ferida e reduz o sofrimento do doente.

Uma vez aplicada a suspensão na ferida pode utilizar-se uma compressa para feridas permeável a gases para cobrir o local. Os fibroblastos da derme da suspensão de microsferas/células migram então e crescem das microsferas para o tecido circundante para produzir uma superfície contínua no local da lesão da pele. Com o passar do tempo e à medida que as células crescem, as microsferas começam a ser reabsorvidas *in vivo*.

Preferencialmente o implante de pele também inclui a regeneração da camada da epiderme. Enquanto a camada de fibroblastos da derme se está a estabelecer *in vivo*, podem então ser cultivadas células da camada de epiderme do doente num frasco de cultura de tecidos. Quando foi produzido um número suficiente de células, as células são retiradas do fundo do frasco de cultura de tecidos utilizando, por exemplo, tripsina. As células são então inoculadas num biorreactor contendo um meio de cultura de células apropriado e microsferas. Tal como discutido anteriormente, outra opção é utilizar células da epiderme de um explante de tecido proveniente do doente para inocular directamente as microsferas. Deixa-se que as células se fixem às microsferas e cultiva-se em suspensão num biorreactor do mesmo modo que o descrito anteriormente para os fibroblastos da derme. Será entendido pelos especialistas na matéria que pode ser necessária a utilização de um antibiótico de largo espectro na fase inicial da proliferação celular devido à probabilidade de contaminação do local da ferida pela flora normal da pele e pela proveniente de outras fontes.



A Figura 4 é uma fotomicrografia de queratinocitos provenientes de perpúcio neo-natal fixados a microsferas de PHB-PHV às 24 horas após a inoculação das células. A maioria dos queratinocitos que se fixaram às microsferas estão achatados e já não são esféricos.

Tal como referido anteriormente, as microsferas podem ser adicionadas ao meio de cultura imediatamente antes da inoculação das células ou as microsferas podem ser pré-tratadas por imersão no meio durante um período de tempo antes da inoculação das células. A Figura 5 é uma fotomicrografia de queratinocitos provenientes de perpúcio neo-natal fixados a microsferas de PHB-PHV às 24 horas após a inoculação das células. As microsferas foram incubadas em meio de cultura durante 24 horas antes da inoculação das células. A maioria dos queratinocitos que se fixaram às microsferas estão achatados.

Quando as células da epiderme, incluindo queratinocitos atingirem a confluência ou próximo da confluência nas microsferas, retira-se algum ou todo o meio de cultura, resultando numa suspensão de microsferas revestidas com células. A compressa da ferida, se existir, é retirada do local da ferida e a suspensão é aplicada sobre a camada de fibroblastos da derme estabelecida ou em estabelecimento para regenerar a camada exterior da pele estabelecendo-se assim uma barreira protectora de pele intacta.

Uma vez aplicada na ferida a suspensão de células da epiderme pode utilizar-se uma compressa para feridas permeável a gases para cobrir a lesão da pele. As células da epiderme migram então e crescem das microsferas para o tecido circundante para produzir uma superfície contínua em substituição da lesão da pele. À medida que as células crescem, inicia-se a reabsorção das microsferas *in vivo*.

f L A

Uma certa percentagem das células da epiderme pode ser tratada quer *in vivo* quer *in vitro* com agentes específicos tais como cálcio e/ou cAMP para acelerar a produção de estrato córneo, a camada mais externa de células mortas, altamente queratinizadas. O estrato córneo ajuda a regular a quantidade de água perdida pelo corpo e também a impedir a invasão microbiana para o local da ferida. Por aceleração controlada da diferenciação desta camada, o local da ferida reparada funcionará mais como pele intacta, não lesionada.

Noutra forma de realização da presente invenção, são co-cultivadas células de ambas as camadas da derme e da epiderme num frasco de cultura de tecidos. Esta forma de realização pode proporcionar desenvolvimento acrescido das funções autócrina e endócrina. Utilizando as mesmas técnicas que as discutidas anteriormente, as células são então retiradas do frasco de cultura de tecidos e inoculadas num biorreactor contendo meio de cultura de células e microsferas. Deixa-se que as células se fixem às microsferas em condições estáticas ou semi-estáticas para co-cultura subsequente em suspensão num biorreactor. Uma microsfere individual pode então ter a ela fixadas células quer das camadas da derme quer da epiderme. A suspensão de microsferas/células resultante é então directamente aplicada na ferida praticamente do mesmo modo que seria utilizado para aplicar uma pomada ou pasta para regeneração simultânea das camadas de derme e de epiderme. Tal como sucede *in vivo*, os queratinocitos diferenciados tendem a migrar para as regiões superiores do local da ferida conduzindo a uma formação natural de um estrato córneo. Pode então utilizar-se uma compressa para feridas permeável a gases para cobrir o local da lesão da pele até a ferida ter efectivamente cicatrizado pela reformação normal dos componentes da derme e da epiderme.

Numa forma de realização adicional da presente invenção, fibroblastos da derme e células provenientes da camada de epiderme são cultivadas independentemente em frascos de cultura

f l A

de tecidos separados. Os fibroblastos da derme são retirados do seu frasco de cultura de tecidos utilizando, por exemplo, tripsina e inoculados num recipiente contendo um meio de cultura de células apropriado e microsferas. Deixa-se que os fibroblastos da derme se fixem às microsferas em condições estáticas ou semi-estáticas.

Analogamente, as células da epiderme, incluindo queratinocitos, são retiradas do seu frasco de cultura de tecidos utilizando, por exemplo, tripsina e inoculadas noutro recipiente contendo um meio de cultura de células apropriado e microsferas. Deixa-se que as células da epiderme se fixem às microsferas em condições estáticas ou semi-estáticas.

As microsferas revestidas com fibroblastos da derme e as microsferas revestidas com células da epiderme são então introduzidas num único biorreactor para co-cultura subsequente. A suspensão resultante de microsferas revestidas com células é então aplicada na ferida para regeneração simultânea das camadas de derme e de epiderme. Pode então aplicar-se uma compressa para feridas permeável a gases para cobrir a ferida.

Ainda noutra forma de realização, fibroblastos da derme são fixados a microsferas e deixados proliferar num biorreactor. Após um período de tempo, células da camada de epiderme são inoculadas no biorreactor para fixação subsequente às microsferas já revestidas em certa medida com fibroblastos da derme. Os queratinocitos podem assim beneficiar dos efeitos endócrinos dos fibroblastos.

A presente invenção também pode ser utilizada para implantes *in vivo* de melanocitos para conferir pigmentação natural à pele e proporcionar protecção contra UV.

Em aplicações cosméticas, por exemplo a reparação de cicatrizes profundas devidas a feridas, acne, etc., a camada de

f. L. A.

epiderme e opcionalmente uma pequena percentagem da camada de derme subjacente podem ser removidas cirurgicamente utilizando um dermatomo ou outro instrumento cirúrgico adequado. Subsequentemente, aplica-se uma suspensão de microsferas revestidas com células directamente na área pré-preparada em uma mais camadas para corrigir variações de contorno.

As microsferas utilizadas na presente invenção podem ser feitas de uma variedade de materiais que são biocompatíveis e capazes de serem rapidamente reabsorvidos pelo organismo por acção enzimática *in vivo* natural sem a formação de subprodutos tóxicos.

Os materiais adequados para as microsferas incluem materiais biorreabsorvíveis de origem natural ou sintética tais como polihidroxibutirato (PHB), copolímeros de PHB-polihidroxivalerato (OHB-PHV), PHB com ligações poliéster, polímeros de lactido-glicolido, lípidos, fosfolípidos, polilactonas, poliésteres, polilactidos, poliglicolidos, polianidridos, colagénio, gelatina e outros materiais reabsorvíveis que não têm um efeito adverso sobre os tecidos durante a cicatrização (i.e. são não tóxicos para as células tal como presentes inicialmente ou por meio de produtos finais da reabsorção). Estes materiais podem ser utilizados na forma pura ou como uma combinação de materiais para acentuar as suas propriedades físico-químicas ou para controlar as suas velocidades de degradação.

Preferencialmente, as microsferas têm uma densidade entre 1,01 até 1,04 g/mL de forma a facilitar a mistura e suspensão em meios de cultura. As microsferas têm uma macroporosidade entre 30 e 80% e uma gama de porosidade de 30 até 80 μm . As microsferas têm uma área superficial relativamente grande, por exemplo, cerca de 5000 cm^2/g de peso seco, em comparação com as matrizes de rede das tecnologias planares do estado da técnica, que geralmente têm áreas superficiais na gama de 200-700 cm^2/g .

Além disso, é necessária uma maior quantidade de material para conferir resistência adequada à matriz de rede. Em conformidade, seria necessário significativamente mais material para a mesma área superficial e, analogamente, mais material teria de ser reabsorvido *in vivo* com a matriz de rede.

Será entendido pelos especialistas na matéria que em vez de microsferas também podem ser utilizadas outras estruturas tais como películas finas, cilindros e formas ovóides no substituto de pele viva da presente invenção.

As microsferas também podem ser formadas com um núcleo de um material e uma camada externa ou revestimento de outro material para melhorar a reabsorbabilidade e funcionalidade das microsferas, incluindo densidade de carga, fixação a outros produtos químicos ou compostos, e aumento da fixação e distribuição das células. Por exemplo, um revestimento de fosfolípidos permite a criação de uma superfície polar com o grupo de cabeça fosfato funcional. Além disso, o grupo acilo do fosfolípido proporciona uma superfície mais hidrófoba à microsfera. Vários produtos químicos ou biomoléculas podem então ser fixados a estas porções de fosfolípidos. Adicionalmente, certos lípidos do estrato córneo incluindo fosfolípidos e esfingosinas podem ser revestidos em microsferas para conferir actividade antimicrobiana. As esfingosinas são particularmente boas na inibição do crescimento microbiano a níveis de μg ("Antimicrobial activity of sphingosines" *J. Invest. Dermatol.* **98**:269-273; 1992).

A Figura 6 é um histograma de resultados produzidos por um citofluorómetro para medição da viabilidade celular. A viabilidade celular é medida com um fluorocromático específico para células viáveis e um fluorocromático específico para células mortas. Estas medições são expressas como "Unidades de Fluorescência Arbitrárias" e é traçado um gráfico no histograma em que as barras sombreadas representam células viáveis e as

barras em branco representam as células mortas. A interpretação dos resultados é corrigida por conjuntos de resultados 1 e 2 para a solução tampão de fosfato e o controlo, respectivamente.

Os queratinocitos do mesmo inóculo de células foram inoculados em PHB ou PHB revestido com um fosfolípido e, em cada caso, incubados durante 24 horas. A viabilidade celular das células fixadas foi medida por introdução dos fluorocromáticos acima referidos na amostra apropriada. As amostras sem células a elas fixadas também foram tratadas como o fluorocromático para proporcionar correcção adicional para o material reabsorvível específico. As amostras isentas de células estão apresentadas nos conjuntos de resultados 3, 5, 7 e 9 que proporcionam factores de correcção para os conjuntos de resultados 4, 5, 8 e 10, respectivamente.

Os conjuntos de resultados 4 e 8 representam a viabilidade de queratinocitos fixados a PHB, enquanto que os conjuntos de resultados 6 e 10 indicam PHB revestido com um fosfolípido. Os materiais reabsorvíveis dos conjuntos de resultados 3, 4, 5 e 6 foram autoclavados antes da inoculação com células enquanto que os materiais reabsorvíveis dos conjuntos de resultados 7, 8, 9 e 10 foram esterilizados por um processo não-térmico com óxido de etileno. Os resultados indicam que as células são altamente viáveis neste materiais reabsorvíveis. Além disso, o método de pré-esterilização (por vapor ou com óxido de etileno) não afecta a eficácia de fixação ou a viabilidade das populações de células.

Noutra forma de realização, a microsfera é formada por combinação do polissacárido e do material reabsorvível de forma que o material reabsorvível fica aleatoriamente distribuído através do núcleo. O polissacárido (tal como dextrano ou amido) pode ser removido por erosão ou digestão quimicamente ou enzimaticamente antes da fase de revestimento da microsfera com células da pele, deixando uma estrutura aberta para melhor

f l A

hidrólise do material reabsorvível uma vez *in vivo*. Este tipo de microsfera reduz as limitações difusionais de nutrientes ou subprodutos metabólicos, deste modo facilitando mais o crescimento das células. Adicionalmente, vários factores de crescimento e outros factores incorporados na ou sobre a microsfera são libertados mais rapidamente, permitindo assim o "acesso" a estes factores na altura apropriada durante o processo de cicatrização.

Alternativamente, a microsfera pode ser utilizada com o componente polissacárido intacto para reabsorção durante a proliferação celular *in vitro* e *in vivo*.

Numa forma de realização preferida da presente invenção as microsferas são reabsorvidas a uma velocidade comparável à da expansão da população celular. Deste modo, à medida que as microsferas são reabsorvidas, as células crescem para o interior dos pequenos espaços vazios deixados pela microsfera parcialmente reabsorvida minimizando assim a formação de cicatrizes e as variações de contorno.

Uma abordagem para a escolha de materiais e/ou factores ou revestimentos é escolher uma combinação para a camada de derme e outra para a camada de epiderme. Preferencialmente, as microsferas na camada de epiderme são reabsorvidas muito mais rapidamente do que o material subjacente para a camada de derme. Isto permite que os queratinocitos migrem e se espalhem na camada de derme subjacente de uma forma mais natural. É possível que os revestimentos sejam diferentes para os diferentes tipos de células embora um tipo de revestimento possa ser adequado.

As microsferas podem ter outras características que lhes são conferidas por incorporação de aditivos nas ou sobre as microsferas, por exemplo por imobilização, encapsulação, ligação covalente, ou por simples adsorção. Estes aditivos são utilizados para aumentar a proliferação celular, para melhorar o

f. L. A.

ambiente local *in vivo* após o implante, e/ou para controlar a libertação de certos agentes. Esses aditivos podem ser incorporados em ou sobre substancialmente todas as microsferas de um implante ou só numa sua proporção.

Por exemplo, a libertação controlada de agentes antimicrobianos é particularmente importante dado que a maioria destes compostos são citotóxicos tanto para fibroblastos da derme como para queratinocitos aos níveis terapêuticos correntemente utilizados clinicamente, resultando num efeito negativo profundo sobre a cicatrização de feridas. Pode conseguir-se uma melhor libertação controlada de agente antimicrobiano por tratamento prévio das microsferas com o agente antimicrobiano, resultando em menos prejuízo para a cicatrização da ferida ao mesmo tempo que se mantém a assepsia.

Alternativamente, a superfície das microsferas pode ser pré-tratada para intensificar a fixação das células, por exemplo com um factor de fixação tal como o tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), ou poli-L-lisina. A Figura 7 é uma fotomicrografia que mostra fibroblastos da derme provenientes de prepúcio neo-natal fixados a microsferas de PHB-PHV tratadas com factor de fixação RGD 1 hora após a inoculação das células. A Figura 8 é uma fotomicrografia que mostra os fibroblastos da derme fixados a microsferas de PHB-PHV tratadas com RGD da Figura 7 às 22 horas após a inoculação das células. A maioria das células que se fixaram às microsferas estão achatadas e já não são esféricas.

A Figura 9 é uma fotomicrografia que mostra fibroblastos da derme provenientes de prepúcio neo-natal fixadas a uma superfície de vidro (controlo) e incubadas durante 26 horas. A Figura 10 é uma fotomicrografia de fibroblastos da derme provenientes de prepúcio neo-natal fixados a uma superfície planar de PHB-PHV e incubados durante 26 horas. A Figura 11 é uma fotomicrografia de fibroblastos da derme provenientes de

f. L. A.

prepúcio neo-natal fixados a uma superfície planar de PHB-PHV tratada com RGD e incubados durante 26 horas. As células viáveis nas Figuras 9, 10 e 11 estão coradas com Vermelho Neutro. O corante é activamente absorvido pelas células viáveis para demonstrar, nas Figuras 10 e 11, que as células são altamente viáveis nos materiais biorreabsorvíveis utilizados.

Outros factores que podem ser incorporados nas microsferas incluem factores de crescimento, tais como factor de crescimento da epiderme (EGF), factor alfa de transformação do crescimento (TGF-A), factor beta de transformação do crescimento (TGF-beta), factor de crescimento de queratinocitos (KGF), factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), e factor de crescimento I semelhante a insulina (IGF-I). Pode obter-se uma libertação controlada destes factores pela utilização de microsferas de forma a obter melhor controlo da cicatrização de feridas, uma vez que se a administração de factores mitogénicos (de crescimento) ou angiogénicos (induzindo a recapilarização da ferida) for excessivamente rápida, pode ocorrer a formação de cicatrizes no local da ferida. Os factores de crescimento também podem ser imobilizados na superfície das microsferas com, por exemplo, uma ligação covalente permanente de modo que as células contactem com o factor de crescimento imobilizado.

Podem ser incorporados anticorpos monoclonais nas microsferas para controlar os níveis locais *in vivo* de TGF-beta, por exemplo, de forma a evitar um suprimento sobre-abundante deste factor num ponto particular no processo de cicatrização da ferida. O TGF-beta, se estiver disponível em quantidades excessivas, pode conduzir a um excesso desproporcionado de produção de colagénio pelos fibroblastos e células macrófagas.

A reabsorção das microsferas pode ser intensificada pela incorporação nas microsferas de enzimas tais como lipase, despolimerase, e desidrogenase. Estas enzimas intensificam a reabsorção por outras enzimas endógenas *in vivo* ou por radicais

f. L. A.

livres produzidos pelo organismo (e.g. células macrófagas) que podem atacar as ligações estruturais conduzindo à despolimerização do material biorreabsorvível.

Também é possível que algumas substâncias ligadas às microsferas, ou nelas incorporadas, possam provir directamente do doente. Por exemplo, o factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (que se sabe que promove a cicatrização de feridas) pode provir das plaquetas do sangue do doente e ser complexado no seio ou sobre as microsferas. A amostra de sangue necessária é relativamente pequena, por exemplo, 100-200 mL.

Outros aditivos incluem poliaminas para mitigar a formação de cicatrizes hipertróficas, materiais que conferem propriedades biostáticas, microbicidas ou anti-rejeição, e proteínóides, para aumento da actividade e/ou da estabilidade.

Além disso, os factores de crescimento, angiogénese e outros factores podem ser incorporados em ou sobre um suprimento adicional de microsferas que não se destinam a ser revestidas com células. Para este fim é possível utilizar microsferas ultra pequenas uma vez que estas não são necessárias em grandes quantidades reduzindo assim a quantidade de material a reabsorver. Estas microsferas ultra pequenas com diâmetros na gama desde 10 até 50 micron podem ser intercaladas com as microsferas maiores revestidas com células no local da ferida ou adicionadas independentemente numa altura apropriada. Os tecidos circundantes podem ser pré-tratados com factores quimiotácticos, angiogénicos, ou mitogénicos revestidos sobre a superfície dessas microsferas isentas de células de forma a melhorar o ambiente para migração celular, administração de nutrientes, migração e crescimento. Outra vantagem da presente invenção é que, embora muitos destes factores tenham uma estabilidade relativamente curta em solução, podem ser preparados de fresco imediatamente antes do tratamento da ferida com as microsferas revestidas com células. Estas microsferas particulares podem ser

f l A

intercaladas e administradas ao mesmo tempo que se administra as células ou alternativamente mais cedo, de forma a estabelecer um ambiente encorajador da migração, angiogénese e/ou proliferação celulares. Pode assim ser criado um ambiente programado para acelerar a regeneração de tecidos e a migração para o local da ferida. Como resultado, a rede capilar subjacente poderia ser aumentada para o fornecimento "normal" de nutrientes às células aplicadas.

Foram conseguidos avanços importantes nos anos mais recentes na formulação de meios de cultura que não contêm soros provenientes de animais. Isto é particularmente importante para tecnologias destinadas a aplicações clínicas humanas. O soro, tipicamente proveniente de fontes bovinas, não só é bastante indefinido como pode conduzir à penetração de contaminantes no produto final e ser responsável por resultados variáveis. Os meios definidos isentos de soro são adequados para a cultura de fibroblastos da derme e queratinocitos. Numerosos meios isentos de soro estão disponíveis comercialmente incluindo, por exemplo, KGM e FGM de Clonetics Corporation e KGM de GIBCO.

Na co-cultura de queratinocitos e fibroblastos da derme, os queratinocitos necessitam de níveis inferiores de cálcio no meio para encorajar taxas de crescimento rápidas e impedir a diferenciação terminal. A níveis de cálcio elevados ($> 0,1$ mM), os queratinocitos tendem a crescer lentamente e a sofrer diferenciação terminal conduzindo a apoptose (morte celular programada). Os fibroblastos da derme são normalmente cultivados em meios com níveis de cálcio na gama de 1 até 3 mM para permitir o crescimento e funcionamento normal. Em conformidade, numa forma de realização os fibroblastos da derme são primeiramente cultivados num meio contendo cálcio numa concentração superior a 0,1 mM. Após um período de tempo, as células são lavadas *in situ* com uma solução de soro fisiológico fosfatado (PBS) para remover o meio de crescimento. Adiciona-se então os queratinocitos e um meio diferente com uma concentração

f l A

reduzida de cálcio ao frasco de cultura de tecidos contendo fibroblastos da derme cultivados. O resultado final na cultura subsequente é um abrandamento do crescimento dos fibroblastos ao mesmo tempo que permite um bom crescimento dos queratinocitos. Esta é uma situação ideal uma vez que permite que uma camada de queratinocitos cresça na presença dos fibroblastos sem sobrecrecimento dos fibroblastos em relação aos queratinocitos. Os fibroblastos, embora não sejam proliferativos, podem ainda produzir os factores requeridos pelos queratinocitos para crescimento e organização óptimos à superfície da derme. Os factores produzidos pelos fibroblastos que podem permitir o crescimento/organização óptimos dos queratinocitos incluem fibronectina e TGF-beta.

A presente invenção proporciona potencial para centralização geográfica das unidades de tratamento de feridas ou queimaduras para a manipulação efectiva de células. A aplicação de fibroblastos da derme em lesões da pele com espessura profunda ou semi-profunda pode ser tornada mais expedita com a manutenção de um "banco" local de fibroblastos da derme provenientes de doadores, incluindo os provenientes de cadáveres, que apresentam alergenicidade muito baixa em transplantes.

Um explante de tecido proveniente de um doente pode então ser enviado num meio de transporte apropriado semelhante ao utilizado para o transporte de órgãos para transplante (tal como a Solução ViaSpan (marca comercial) UW (Dupont), ou outro meio de manutenção) para uma unidade de processamento de células centralizada para cultura dos queratinocitos enquanto o doente está já a ser tratado com uma suspensão de fibroblastos da derme/microsféricas. Tipicamente, um explante de tecido com 4 cm² podia ser rapidamente transportado e expandido para tratar uma área de tecido equivalente a vários metros quadrados em 1 até 3 semanas se necessário. O crescimento de células suficientes para

tratamento é acentuadamente mais rápido e mais eficaz do que as abordagens convencionais referidas.

Uma vez obtida uma população celular de dimensão apropriada, as microsferas revestidas com células podem ser colhidas, concentradas e colocadas num meio de manutenção para envio para o centro de tratamento distante. Grandes números de células, da ordem dos 10^7 células/mL, podem ser transportados nas microsferas num volume relativamente pequeno. Isto constitui uma vantagem em relação à tecnologia planar que requer um grande número de recipientes para uma quantidade equivalente de células. Além disso, o transporte das matrizes de rede é dificultado pela natureza frágil da preparação de tecidos. A suspensão de microsferas/células da presente invenção é menos frágil e pode ainda ser satisfatoriamente expedida em condições menos do que ideais.

As microsferas revestidas com células podem ser transportadas num meio semelhante ao utilizado para o transporte de órgãos para transplantes tais como o coração. Além disso, o meio pode ser adaptado para incluir perfluorocarbonetos para transferência de oxigénio acrescida. A suspensão de microsferas/células requer pouco ou nenhum tratamento adicional antes da aplicação na lesão da pele. Tecnologias conhecidas tais como membranas tangencias ou de caudal transversal ou membranas de fibras ocas também podem ser utilizada no transporte retendo assim as células/microsferas enquanto se manipula o ambiente em que residem.

Os implantes de matriz de rede discutidos anteriormente são tipicamente crio-conservados para permitir o seu transporte. Contudo, será entendido pelos especialistas na matéria que o meio de crio-conservação pode incluir sulfóxido de dimetilo (DMSO) que requer técnicas elaboradas incluindo um ambiente estéril e numerosas manipulações, sendo necessário um laboratório de cultura de tecidos no local de recepção para a

sua remoção antes do implante. Este tipo de unidade não está sempre disponível no local quando ou em que o tratamento é necessário.

APLICAÇÃO INDUSTRIAL

A presente invenção permite um tratamento rápido e eficaz de lesões da pele com espessura profunda ou semi-profunda, tais como queimaduras e outras feridas. Ao contrário dos métodos convencionais, a presente invenção não requer a utilização de agramos, suturas, ou outros métodos de fixação para aplicação ao doente, nem está limitada por problemas associados ao perfil ou curvaturas do corpo. Além disso, a aplicação da suspensão de microsferas/células pode ser realizada em condições tanto ideais como menos ideais.

O substituto de pele viva da presente invenção também pode ser utilizado como um "modelo de pele" em ensaios de avaliação de risco e segurança para compostos farmacêuticos, cosméticos e de uso doméstico. Esta é uma área em crescimento devido à exigência para evitar os testes em animais.

A presente invenção também encontra utilidade no sector cosmético para correcção de defeitos da pele.

Lisboa, 20 de Setembro de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'h' followed by a tilde-like symbol and a capital 'A' with a horizontal stroke.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição para substituição de pele viva para lesões da pele com espessura profunda ou semi-profunda que se adapta à forma das lesões, caracterizada por a composição compreender uma suspensão de um veículo líquido biologicamente aceitável, microsferas, compreendendo as microsferas um material que é biocompatível e reabsorvível *in vivo*, tendo as microsferas uma macroporosidade de 30 a 80%, e células da pele proliferativas seleccionadas do grupo que consiste em queratinocitos, fibroblastos da derme, melanocitos e suas combinações, a revestir as microsferas.
2. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por as células da pele serem fibroblastos da derme.
3. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por as células da pele serem queratinocitos ou melanocitos.
4. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por as células da pele serem uma combinação de fibroblastos da derme, queratinocitos e melanocitos.
5. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 ou 4, caracterizada por as células da pele serem obtidas de um doente com uma lesão da pele.
6. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 1, 2, 3 ou 4, caracterizada por as células da pele serem obtidas de um dador diferente de um doente com uma lesão da pele.

f L A

7. Composição para substituição de pele viva de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizada por as microsferas serem formadas por pelo menos um material seleccionado do grupo que consiste em polihidroxibutirato (PHB), copolímeros de PHB-polihidroxivalerato (OHB-PHV), PHB com ligações poliéster, polímeros de lactido-glicolido, lípidos, fosfolípidos, polilactonas, poliésteres, polilactidos, poliglicolidos, polianidridos, colagénio, e gelatina.
8. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por as microsferas serem formadas por um núcleo de um material e um revestimento de outro material.
9. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 8, caracterizada por as microsferas serem revestidas com um fosfolípido ou uma esfingosina.
10. Composição para substituição de pele viva de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizada por as microsferas serem formadas por polihidroxibutirato e polissacárido.
11. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 10, caracterizada por o polissacárido sofrer erosão ou ser removido quimicamente ou enzimaticamente antes do revestimento das microsferas com as células.
12. Composição para substituição de pele viva de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizada por compreender adicionalmente um aditivo seleccionado do grupo que consiste em: (i) um polipéptido tal como lipase, despolimerase, desidrogenase, factor de crescimento derivado de plaquetas, preferencialmente um factor de

f L A

crescimento derivado de plaquetas obtido de um doente com uma lesão da pele, factor do crescimento da epiderme, factor alfa de transformação do crescimento, factor beta de transformação do crescimento, factor do crescimento semelhante a insulina, factor de crescimento de queratinocitos, factor de crescimento de fibroblastos básico, tripéptido de arginina-glicina-ácido aspártico, poli-L-lisina e colagénio; (ii) um agente antimicrobiano, e (iii) uma poliamina.

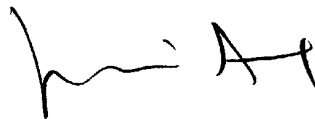
13. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por o aditivo ser incorporado nas ou sobre as microsferas antes do revestimento das microsferas com células da pele.
14. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por o aditivo ser incorporado em ou sobre microsferas adicionais adicionadas à suspensão antes da aplicação na lesão da pele.
15. Composição para substituição de pele viva de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizada por o diâmetro médio das microsferas estar na gama desde cerca de 50 até 500 μm , preferencialmente cerca de 80 até 250 μm .
16. Composição para substituição de pele viva de acordo com a reivindicação 14, caracterizada por o diâmetro médio das microsferas adicionais estar na gama de cerca de 10 até 500 μm , preferencialmente cerca de 10 até 50 μm .
17. Processo para a produção de uma composição para substituição de pele viva de acordo com qualquer das reivindicações anteriores, caracterizado pelos passos de cultivar células da pele seleccionadas do grupo que consiste em queratinocitos, fibroblastos da derme,

melanocitos ou suas combinações, proporcionar uma pluralidade de microsferas biocompatíveis, reabsorvíveis com uma macroporosidade de 30 até 80%, fixar as células da pele às microsferas e cultivar as células da pele fixadas até à confluência ou próximo da confluência num meio de cultura para produzir microsferas revestidas com células da pele proliferativas, e em seguida concentrar as microsferas revestidas com células até uma suspensão num veículo biologicamente aceitável, em que quando as microsferas revestidas com células são aplicadas numa lesão da pele, as células proliferativas migram das microsferas para a lesão.

18. Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado por se utilizar uma combinação de fibroblastos da derme e queratinocitos e o passo de crescimento das células compreender o crescimento de fibroblastos da derme num primeiro meio contendo cálcio numa concentração superior a cerca de 0,1 mM, e subsequentemente lavagem das células com uma solução tampão para remover o primeiro meio, e o crescimento de queratinocitos num segundo meio contendo cálcio numa concentração inferior a cerca de 0,1 mM.
19. Processo de acordo com a reivindicação 18, em que o meio de cultura está isento de soro.

Lisboa, 20 de Setembro de 2001

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL:



f L A

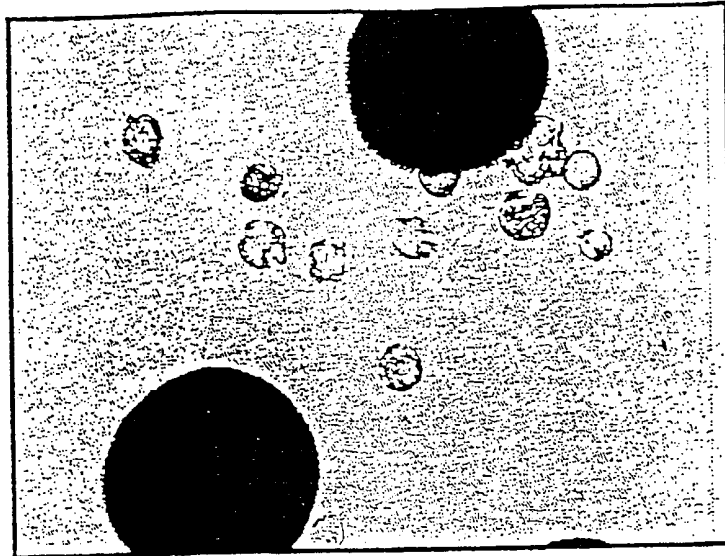


FIG. 1

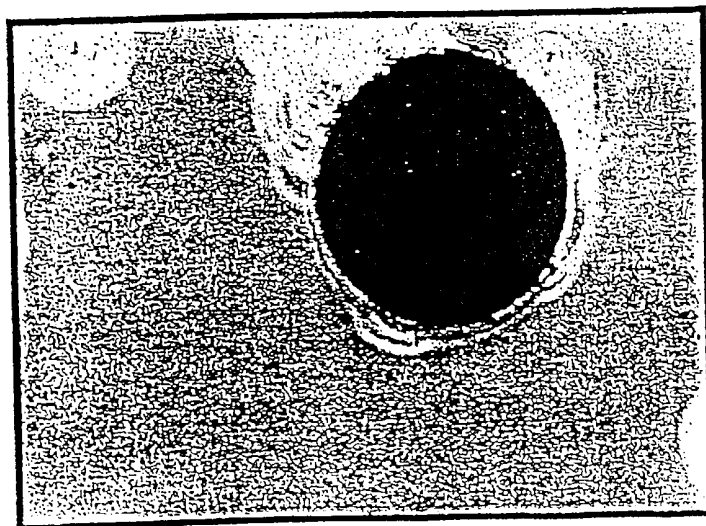


FIG. 2

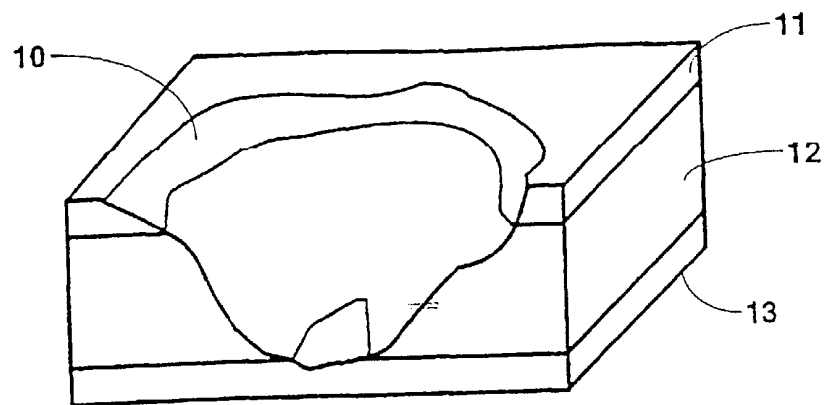


FIG.3A

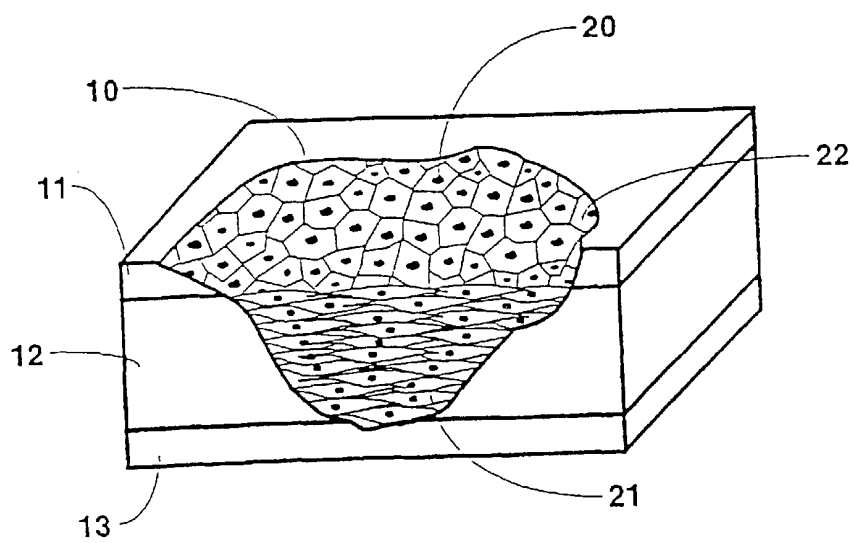


FIG. 3B

FLA

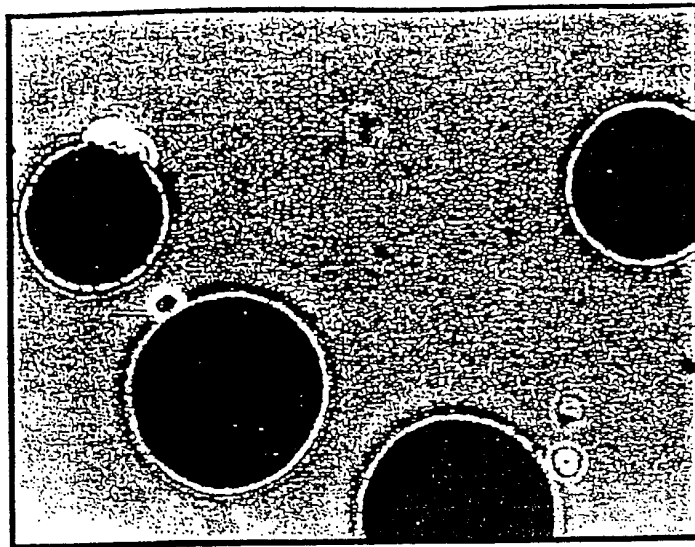


FIG. 4

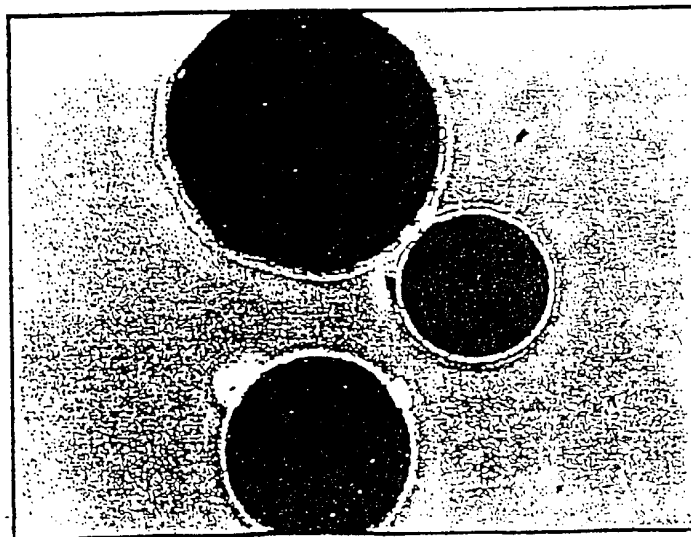


FIG. 5

f l A

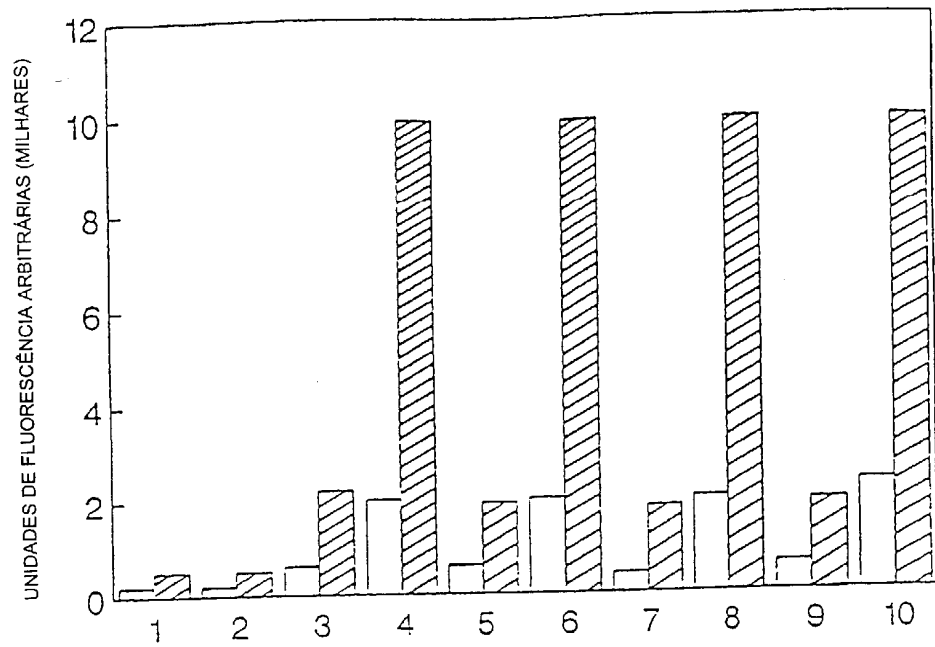


FIG. 6

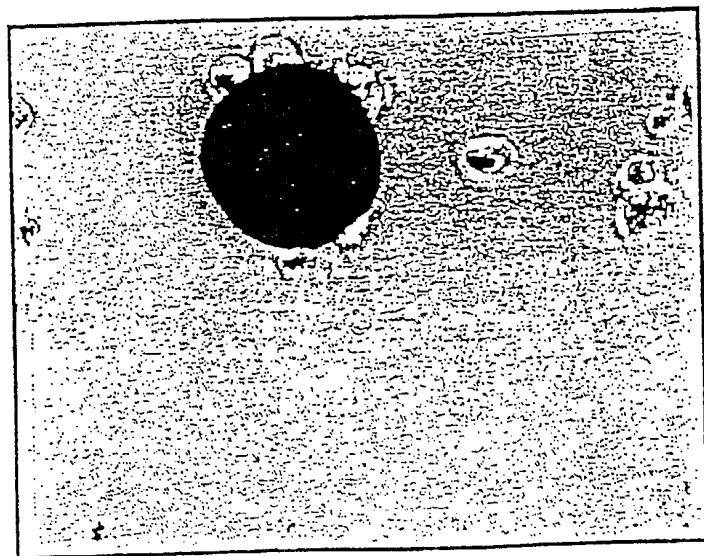


FIG. 7

f L A

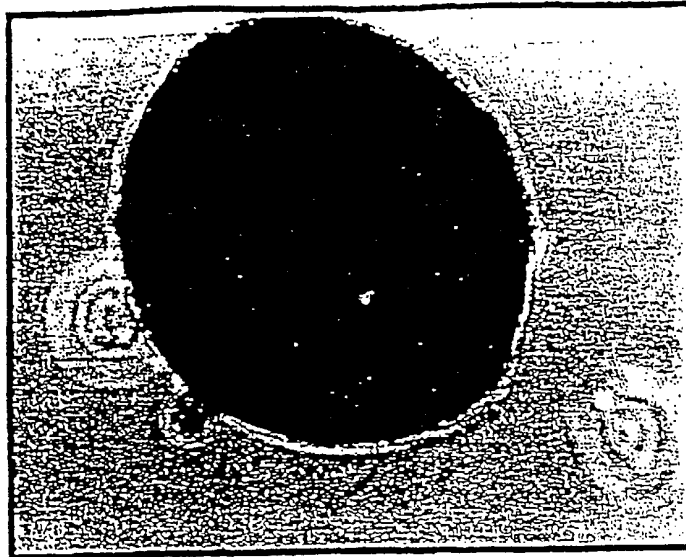


FIG. 8

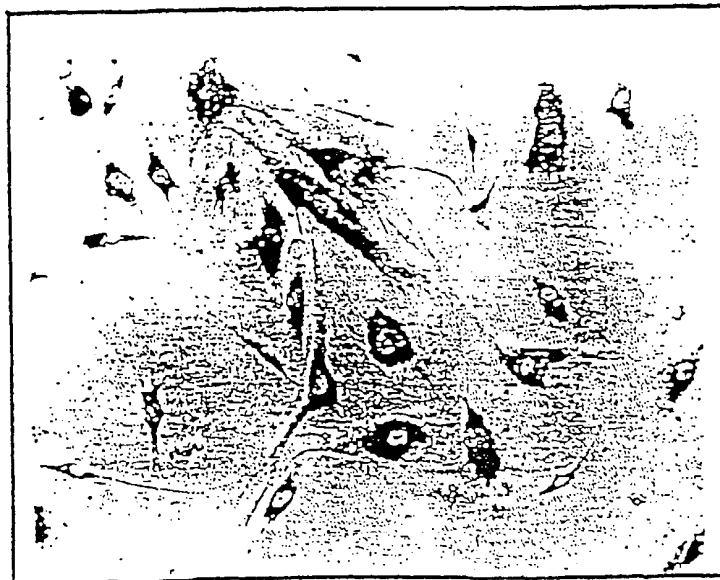


FIG. 9

FLA

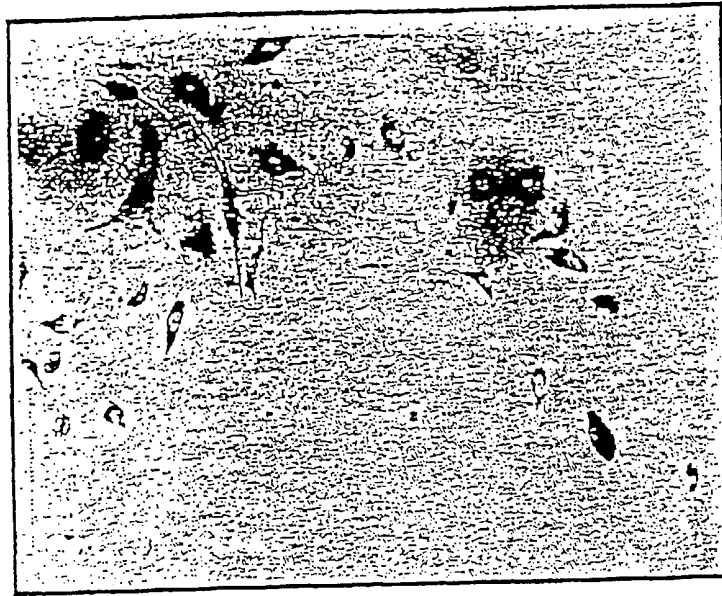


FIG. 10



FIG. 11