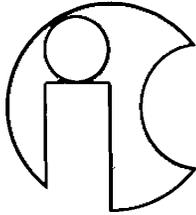




No. 12-229259-00000-0000

Fecha: 2012-12-18 15:25:20 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 68

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO PROCESO PARA LA PRODUCCION DE PANCHES
O ABÓSITOS DE PIEL AUTÓLOGA MEDIANTE CULTIVO DE
QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS AUTÓLOGOS CON SERO AUTÓLOGO
PARA GENERACION DE PIEL.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C 12N 5/071 (20.01)71. SOLICITANTE SOTO PAREJA, RODRIGO FOCÓNDOMICILIO BOGOTÁ D.C - COLOMBIA74. APODERADO JESÚS M. MÉNDEZ BERMUDEZ22. BOGOTÁ, D.C., 18 DE DICIEMBRE DE 2012



DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	<input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención <input checked="" type="checkbox"/> Capítulo I	<input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad <input type="checkbox"/> Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
	Solicitud Internacional No.	PCT/IB2010/001215	Fecha 21.05.2010
	Publicación Internacional No.	WO2011/144956	Fecha 24.11.2011
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
	PROCESO PARA LA PRODUCCION DE PARCHES O APÓSITOS DE PIEL AUTOLOGA MEDIANTE CULTIVO DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS AUTOLOGOS CON SUERO AUTÓLOGO PARA GENERACION DE PIEL		
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
	C12N 5/071 (2010.01)		
5	SOLICITANTE (S) <input type="checkbox"/> Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
		SOTO PAREJA, Rodrigo Foción	
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
	DIRECCIÓN: Transversal 5 No. 87- 31 Ap. 202, 10 Bogotá D.C.- Colombia CIUDAD: Bogotá D.C.		No. TELÉFONO: 6235828
	DEPARTAMENTO/ESTADO: Bogotá D.C.		CORREO ELECTRÓNICO: notificaciones@wolfmendez.com
	PAÍS DE RESIDENCIA: Colombia		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
	1.ZAMBRANO BURGL	Juan Carlos	Colombia
	2.GAONA SILVA	Jennifer Cristina	Colombia
	DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificaciones@wolfmendez.com		
8	DATOS INVENTOR (ES)		
	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN
	1.Colombia	Bogotá D.C.	Bogotá D.C. Carrera 7 No. 127A – 69, Ap 505, 10 Bogotá D.C.
	2. Colombia	Bogotá D.C.	Bogotá D.C. Carrera 7 No. 127A – 69, Ap 505, 10 Bogotá D.C.
	OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)		
	<input type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.		
9	<input type="checkbox"/> REPRESENTANTE LEGAL <input checked="" type="checkbox"/> APODERADO		
	APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
	Méndez Bermúdez	Jesús M.	C.C. 13.491.525 T.P. 99.678
	DIRECCIÓN	Calle 83 A No. 23-90	No. TELÉFONO 6235828
	CIUDAD	Bogotá D.C.	CORREO ELECTRÓNICO notificaciones@wolfmendez.com
	PAÍS	Colombia	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL -----
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO		
	(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA (AAAA/MM/DD)

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN		
	<input checked="" type="checkbox"/> Patente de invención <input type="checkbox"/> Patente de Modelo de Utilidad		FECHA DE PRESENTACIÓN 18 de Diciembre de 2012.		
4	(71) SOLICITANTE (S)				
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE		IDENTIFICACIÓN	TIPO
		SOTO PAREJA, Rodrigo Foción			
5	DATOS DEL SOLICITANTE				
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN	
Colombia		Bogotá D.C.	Bogotá D.C.	Transversal 5 No. 87- 31 Ap. 202, 10 Bogotá D.C.- Colombia	
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD	
6235828		6170614	notificaciones@wolfmendez.com	Colombia	
6	(72) INVENTOR (ES)				
APELLIDOS		NOMBRE		NACIONALIDAD	
1. ZAMBRANO BURGL		Juan Carlos		Colombia	
2. GAONA SILVA		Jennifer Cristina		Colombia	
7	DATOS INVENTOR (ES)				
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA	
1. Carrera 7 No. 127A – 69, Ap 505, 10 Bogotá D.C.		Bogotá D.C.	Bogotá D.C.	Colombia	
2. Carrera 7 No. 127A – 69, Ap 505, 10 Bogotá D.C.		Bogotá D.C.	Bogotá D.C.	Colombia	
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD				
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)	

CÓMO DILIGENCIAR EL PETITORIO PCT

Este formulario debe ser diligenciado únicamente por el (los) solicitante(s) que desea entrar en Colombia a la Fase Nacional en virtud del Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT).

1. **TIPO DE SOLICITUD**
Marcar en la casilla correspondiente si se trata de una solicitud internacional de Patente de Invención o de Patente de Modelo de Utilidad. Únicamente se acepta una opción por cada solicitud. Indique si la solicitud se tramitó bajo el Capítulo I o el Capítulo II
2. **DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT**
Indique el número asignado como Solicitud Internacional por la Oficina receptora y la fecha de presentación de la solicitud. Además, indique el número y la fecha de la publicación internacional.
3. **TÍTULO DE LA INVENCION**
Defina en forma breve y precisa el nombre técnico de la invención que deberá ser congruente con las reivindicaciones y la descripción. El título no debe referirse a marcas ni nombres comerciales. Máximo 200 caracteres.
4. **CIP (Clasificación Internacional de Patentes)**
Indique las clasificaciones que aparecen en la publicación internacional.
5. **SOLICITANTE (S)**
Si existieran más solicitantes, utilícese las hojas de información complementaria.
- **Apellidos o Razón Social.**
En el caso de ser el solicitante una persona natural, indíquese los dos apellidos.
En el caso de ser el solicitante una persona jurídica indíquese la razón social completa de ésta.
- **Nombre.**
Llénese únicamente para personas naturales.
- **Identificación.**
Solo para solicitantes nacionales: Las personas naturales indicarán su C.C. (cédula de ciudadanía) y las personas jurídicas indicarán el NIT (Número de Identificación Tributaria).
- **Tipo de solicitante.**
Las personas jurídicas habrán de contestar con un dígito: [1] Microempresa: menos de 10 trabajadores, activos totales inferiores a 501 salarios mínimos legales vigentes. [2] Pequeña empresa. Entre 11 y 50 trabajadores, activos totales mayores a 501 y menores a 5.001 salarios mínimos mensuales vigentes. [3] Mediana empresa: personal entre 51 y 200 trabajadores, activos totales entre 5.001 y 15.000 salarios mínimos mensuales legales vigentes. [4] La empresa no es PYME. Si la persona jurídica no es empresa, indicar [5] Institución educativa (universidad, colegio, instituto, etc.). [6] Centro de investigación. [7] Si es persona natural.
6. **DATOS DEL SOLICITANTE**
Los datos indicados en esta sección, servirán para las posibles comunicaciones que la SIC realice, en caso de que la tramitación no se haga por intermedio de un representante o apoderado.
- **Dirección, ciudad, departamento/estado/provincia y país de residencia.**
Indíquese los datos completos de localización. Puede utilizar abreviatura del país (código de País según norma ST. 3 de OMPI). En caso de ser necesario, por falta de espacio, utilice las hojas de información complementarias.
- **Nacionalidad.**
Indíquese la nacionalidad del solicitante. En caso de ser una persona jurídica, indíquese el lugar de constitución. Puede utilizar abreviatura del país (código de País según norma ST. 3 de OMPI). En caso de ser necesario, por falta de espacio, utilice las hojas de información complementarias.
e-mail: Indicar claramente el correo electrónico con el fin de establecer comunicación.
7. **INVENTORES**
Indicar Apellidos, nombre y nacionalidad del inventor o inventores (deben ser personas naturales) en las casillas correspondientes. En caso de ser necesario, por falta de espacio, utilice las hojas de información complementarias.
8. **DATOS DE LOS INVENTORES**
- **Dirección, ciudad, departamento/estado/provincia y país de residencia.**
Indicar los datos completos de localización. Puede utilizar abreviatura del país (código de País según norma ST. 3 de OMPI).
9. **REPRESENTANTE O APODERADO**
Si la solicitud la presenta una persona natural sin apoderado, no debe diligenciarse esta sección.
Si la solicitud se presenta a través de apoderado, debe diligenciarse esta sección indicando el nombre del representante legal. Deberá anexarse el documento que acredite la existencia y representación legal
Si la solicitud se presenta a través de apoderado, debe diligenciarse esta sección indicando el nombre del abogado que adelantará la actuación administrativa. Deberá anexarse el poder.
Número de Protocolo: En caso de haber presentado poder general y tiene un número de protocolo asignado por favor escribirlo.
10. **DECLARACIÓN DE PRIORIDAD**
Si el solicitante reclamó prioridad en la Solicitud Internacional indicar:- País de origen.
Indique el país donde se presentó por primera vez la solicitud. Puede utilizar abreviatura del país (código de País según norma ST. 3 de OMPI).
- Número.
Indique el número asignado a la solicitud en el país del que se reivindica prioridad.
- Fecha (AAAA/MM/DD).
Indique la fecha de solicitud en el país del que se reivindica prioridad.
En caso de ser necesario, por falta de espacio, utilice las hojas de información complementarias.
11. **DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS**
Marcar "SI" cuando la invención fue desarrollada a partir de recursos genéticos o recursos biológicos de los que cualesquiera de los países miembros de la Comunidad Andina (Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú) es país de origen y anexar el contrato de acceso emitido por la Autoridad Nacional Competente (Ministerio del Medio Ambiente para Colombia).
12. **DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES**
Si la invención fue desarrollada usando conocimiento tradicional asociado a recursos genéticos o recursos biológicos de comunidades indígenas, afrodescendientes o locales de países miembros de la Comunidad Andina, debe anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional emitido por la comunidad.
14. **COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO**
Indique el número y fecha del recibo de pago de la tasa establecida o del pago electrónico. El comprobante de pago deberá anexarse.
15. **FIRMA**
Escribir el nombre completo y la firma de la persona que solicita la concesión de la patente.
Si se actúa a través de abogado la firma deberá ser la del apoderado; si actúa directamente una persona jurídica la firma deberá ser la del representante legal y si actúa directamente una persona natural ésta deberá firmar la solicitud.
16. **RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD**
La documentación de la solicitud deberá presentarse en el orden que viene la relación de documentos, primero la documentación técnica y luego la documentación jurídica.
Señale en las casillas correspondientes a los documentos que acompañarán la solicitud e indíquese los números de folios y el número de reivindicaciones que correspondan.
OTROS : LISTADO SE SECUENCIAS
Si la solicitud contiene listado de secuencias aminoácidos y/o secuencias nucleótidos, estas deben suministrarse también en formato digital (CD o DVD con listado de secuencias en archivo de texto alfanumérico)

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 21 de Diciembre de 2012
(51) Clasificación Internacional : C12N 5/071 (2010.01)

(71) Solicitante (s):
SOTO PAREJA, Rodrigo Foción

(72) Inventor (es):
1.ZAMBRANO BURGL, Juan Carlos
2.GAONA SILVA, Jennifer Cristina

(74) Apoderado: JESUS M. MÉNDEZ BERMÚDEZ

(30) Prioridad: NO (31) ----- (32) ----- (33) -----

(85) Fecha límite inicio fase nacional: **21 de Diciembre de 2012.** (87) Publicación internacional:
(86) Datos relativos a la presentación de la PCT Fecha: 24.11.2011
Fecha de presentación de la solicitud: **21.05.2010** No. Publicación: **WO/2011/144956**
No. de solicitud: **PCT/IB2010/001215**

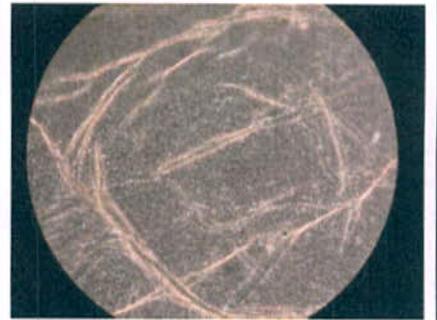


Fig 4. Apósitos de colágeno con fibroblastos y queratinocitos.

(54) Título: PROCESO PARA LA PRODUCCION DE PARCHES O APÓSITOS DE PIEL AUTOLOGA MEDIANTE CULTIVO DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS AUTOLOGOS CON SUERO AUTÓLOGO PARA GENERACION DE PIEL

(57) Resumen:

A partir de 2008, un grupo de médicos cirujanos y cirujanos plásticos emprendió la tarea de buscar una manera de crear piel evitando las complicaciones anteriormente mencionadas. De esta forma decidimos buscar la forma de crear piel a partir de una porción muy pequeña (3 mm) de piel de la persona afectada, garantizando los beneficios de utilizar tejido cultivado y evitando las desventajas de los riesgos de incompatibilidad y de altos costos.

Las ventajas del nuestro proceso de creación de la piel a partir de células del mismo paciente tiene implicaciones muy importantes para la ciencia y el futuro de la cirugía plástica y la medicina a nivel mundial. Dentro de los mismos es importante destacar:

1. El proceso no deja cicatriz adicional a la de la quemadura ya que la piel que se toma es mínima y de lugares no visibles.
2. No crea un trauma en el paciente por lo cual no genera dolor.
3. No tiene problemas de rechazo inmunológico ya que los tejidos usados son del mismo paciente.
4. No es requisito realizar el procedimiento en cirugía.
5. El proceso puede ser manejado por enfermeras y médicos de cualquier especialidad.
6. No es necesario que el hospital donde se esta tratando al paciente adquiera los materiales especiales de toma de piel (llamado Dermatomo), y las cuchillas para el mismo, las cuales son de alto costo ya que son de un solo uso. Estos productos son suministrados por nosotros en nuestro laboratorio.
7. El costo de producción es un 80% más económico que el de la piel de cadáver y los resultados estéticos mucho mejores.
8. El costo de producción y distribución es 50% mas bajo que el costo de un procedimiento quirúrgico para un área de 20 x 20 cm.

Es un proceso que, con un entrenamiento básico, es replicable en cualquier lugar del mundo, incluidos países en vía de desarrollo, ya que todos los materiales utilizados son los de uso básico de cualquier laboratorio.

A continuación se presenta un breve análisis comparativo que muestra el estado de la técnica en varias modalidades frente a la presente invención. Dicho análisis tiene como objetivo destacar las ventajas de la presente invención las cuales le conceden las características necesarias para el otorgamiento de la patente solicitada.

Existe una gran multitud de documentación que muestra el estado de la técnica en donde se detallan los procesos utilizados y en base a esos documentos que se citan a continuación se puede hacer la comparación detallada de dichos procesos frente al proceso de la presente invención y llegar a las conclusiones expuestas arriba en este documento. Dichas referencias se dan más adelante, las cuales pueden ser consultadas.

Desde hace varios años se vienen desarrollando diferentes métodos de cultivos celular para cobertura de áreas cruentas de piel y/o sustitutos cutáneos, la novedad en nuestro producto es que es producido de células autólogas con suero del paciente (Autólogo), logrando capas de piel en tres días. Entre los otros métodos encontramos:

	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN	
	<input checked="" type="checkbox"/> Patente de Invención <input type="checkbox"/> Patente modelo de utilidad <input checked="" type="checkbox"/> PCT	
(21) No. De solicitud:	(51) int. Cl: C12N 5/071 (2010.01)	
(22) Fecha de solicitud: 18 de Diciembre de 2012	(71) Solicitante: SOTO PAREJA, Rodrigo Foción	
(30) Prioridad: NO	(72) Interventor (es):	
(31) No. Prioridad:	1.ZAMBRANO BURGL, Juan Carlos	
(32) Fecha:	2.GAONA SILVA, Jennifer Cristina	
(33) Pais:	(74) Apoderado (s): JESÚS M. MÉNDEZ BERMÚDEZ	
(54) Título: PROCESO PARA LA PRODUCCION DE PARCHES O APÓSITOS DE PIEL AUTOLOGA MEDIANTE CULTIVO DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS AUTOLOGOS CON SUERO AUTÓLOGO PARA GENERACION DE PIEL		
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT		
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional: 21 de Diciembre de 2012		
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: Fecha 21.05.2010 No. de solicitud PCT: PCT/IB2010/001215	(87) Publicación internacional Fecha: 21/12/2011 Fecha (dd/mm/aa) No. Publicación: WO/2011/144956	

Resumen:

A partir de 2008, un grupo de médicos cirujanos y cirujanos plásticos emprendió la tarea de buscar una manera de crear piel evitando las complicaciones anteriormente mencionadas. De esta forma decidimos buscar la forma de crear piel a partir de una porción muy pequeña (3 mm) de piel de la persona afectada, garantizando los beneficios de utilizar tejido cultivado y evitando las desventajas de los riesgos de incompatibilidad y de altos costos.

Las ventajas del nuestro proceso de creación de la piel a partir de células del mismo paciente tiene implicaciones muy importantes para la ciencia y el futuro de la cirugía plástica y la medicina a nivel mundial. Dentro de los mismos es importante destacar:

1. El proceso no deja cicatriz adicional a la de la quemadura ya que la piel que se toma es mínima y de lugares no visibles.
2. No crea un trauma en el paciente por lo cual no genera dolor.
3. No tiene problemas de rechazo inmunológico ya que los tejidos usados son del mismo paciente.
4. No es requisito realizar el procedimiento en cirugía.
5. El proceso puede ser manejado por enfermeras y médicos de cualquier especialidad.
6. No es necesario que el hospital donde se está tratando al paciente adquiera los materiales especiales de toma de piel (llamado Dermatomo), y las cuchillas para el mismo, las cuales son de alto costo ya que son de un solo uso. Estos productos son suministrados por nosotros en nuestro laboratorio.
7. El costo de producción es un 80% más económico que el de la piel de cadáver y los resultados estéticos mucho mejores.
8. El costo de producción y distribución es 50% más bajo que el costo de un procedimiento quirúrgico para un área de 20 x 20 cm.

Es un proceso que, con un entrenamiento básico, es replicable en cualquier lugar del mundo, incluidos países en vía de desarrollo, ya que todos los materiales utilizados son los de uso básico de cualquier laboratorio.

A continuación se presenta un breve análisis comparativo que muestra el estado de la técnica en varias modalidades frente a la presente invención. Dicho análisis tiene como objetivo destacar las ventajas de la presente invención las cuales le conceden las características necesarias para el otorgamiento de la patente solicitada.

Existe una gran multitud de documentación que muestra el estado de la técnica en donde se detallan los procesos utilizados y en base a esos documentos que se citan a continuación se puede hacer la comparación detallada de dichos procesos frente al proceso de la presente invención y llegar a las conclusiones expuestas arriba en este documento. Dichas referencias se dan más adelante, las cuales pueden ser consultadas.

Desde hace varios años se vienen desarrollando diferentes métodos de cultivos celular para cobertura de áreas cruentas de piel y/o sustitutos cutáneos, la novedad en nuestro producto es que es producido de células autólogas con suero del paciente (Autólogo), logrando capas de piel en tres días. Entre los otros métodos encontramos:

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO			
PATENTE PCT	<input checked="" type="checkbox"/>	MODELO DE UTILIDAD	<input type="checkbox"/>
			DISEÑO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/>
SOLICITANTE/S, RAZON SOCIAL O APELLIDOS Y NOMBRES <u>SOTO PAREJA, Rodrigo Foción</u>			
DOMICILIO <u>Bogotá D.C. - Colombia</u>			
APODERADO <u>JESUS M. MÉNDEZ BERMÚDEZ</u>			
TITULO <u>PROCESO PARA LA PRODUCCION DE PARCHES O APÓSITOS DE PIEL AUTOLOGA MEDIANTE CULTIVO DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS AUTOLOGOS CON SUERO AUTÓLOGO PARA GENERACION DE PIEL</u>			
CLASIFICACION			
EXPEDIENTE No.	FECHA DE SOLICITUD	<u>18 de Diciembre de 2012</u>	ROLLO MICROFILM
CERTIFICADO No.	FECHA DE CONCESION		VIGENCIA DESDE HASTA
PRORROGA			
TRASPASO A			
INVENTOR (ES) <u>ZAMBRANO BURGL, Juan Carlos</u>			
<u>GAONA SILVA, Jennifer Cristina</u>			
OTROS			

8

PROCESO PARA LA PRODUCCION DE PARCHES O APÓSITOS DE PIEL AUTOLOGA MEDIANTE CULTIVO DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS AUTOLOGOS CON SUERO AUTÓLOGO PARA GENERACION DE PIEL

Campo Técnico

La presente invención está relacionada con un proceso la formación de apósitos o parches de piel para cubrir, curar, cicatrizar, aliviar pérdidas cutáneas en pacientes. En particular se refiere a un proceso para generar piel que se lleva a cabo en un laboratorio.

Antecedentes de la invención

En la actualidad las quemaduras profundas, así como otras pérdidas de tejido cutáneo por diferentes traumas o enfermedades, causan lesiones a la piel que requieren manejo de cobertura de estas áreas. Esta cobertura se realiza actualmente con injertos de piel parcial que se toman directamente de piel del mismo paciente. El procedimiento, aunque muy efectivo, genera una cicatriz importante en el área donde se toma el injerto (muslos espalda, glúteos) (Foto 1). Adicionalmente este procedimiento se debe realizar en cirugía con anestesia general o regional lo cual trae complicaciones inertes a cualquier procedimiento quirúrgico tales como: dolor severo, infección, sangrado, requerimiento de reintervenciones y, aunque en muy bajo porcentaje, la muerte. Además, económicamente también genera gastos adicionales como la hospitalización, analgésicos, consultas para curaciones, tratamientos para las cicatrices del área donante, materiales especiales para la cirugía y traslado de pacientes a hospitales de mayor complejidad, entre otros.

Las avulsiones de la piel causan lesiones al tejido epitelial cutáneo causando una pérdida de células, siendo reemplazadas por una matriz fibrosa producida por fibroblastos que actúan como capa alimentadora en condiciones *in vivo*. Existen diversos reportes de cultivo de queratinocitos en la construcción de parches regenerativos de piel, todos estos reportes son con células tomadas de donantes o de cadáveres (heterólogo), lo que implica realizar múltiples estudios tanto al donante como al receptor, cultivados en suero fetal bovino, el cual hace que el producto sea muy costoso e inviable en países en vía de desarrollo, por lo que se desarrollo el cultivo de queratinocitos en suero del mismo paciente (autólogo), sobre fibroblastos del mismo paciente (autólogos) como capa alimentadora, y con queratinocitos del mismo paciente (autólogo), evitando así reacciones inmunológicas y de rechazo para cubrimiento de áreas cruentas mejorando la viabilidad cutánea en procesos invasivos

logrando con este medio epitelización (crecimiento de piel) completa en muy corto tiempo, con excelentes resultados y a costos muy bajos.

Dado lo anterior, en el mundo se han buscado mecanismos alternativos para cubrir las áreas afectadas. Dentro de los mismos se destaca el proceso para crear piel que permita reemplazar la piel perdida, y evitar todo el trauma antes mencionado. Hasta el momento, el proceso, se había logrado desarrollar a partir de células de cadáver, no obstante el proceso presentaba problemas pues al ser piel de cadáver la utilizada en muchos casos se creaba una reacción inmunológica que podía generar rechazo al tejido y resultados poco satisfactorios. Adicionalmente los costos de este proceso son sumamente elevados pues al ser piel tomada de cadáver se deben realizar múltiples exámenes de compatibilidad inmunológica y otros para descartar enfermedades contagiosas como VIH y Hepatitis.

Resumen de la invención

A partir de 2008, un grupo de médicos cirujanos y cirujanos plásticos emprendió la tarea de buscar una manera de crear piel evitando las complicaciones anteriormente mencionadas. De esta forma decidimos buscar la forma de crear piel a partir de una porción muy pequeña (3 mm) de piel de la persona afectada, garantizando los beneficios de utilizar tejido cultivado y evitando las desventajas de los riesgos de incompatibilidad y de altos costos.

Las ventajas del nuestro proceso de creación de la piel a partir de células del mismo paciente tiene implicaciones muy importantes para la ciencia y el futuro de la cirugía plástica y la medicina a nivel mundial. Dentro de los mismos es importante destacar:

1. El proceso no deja cicatriz adicional a la de la quemadura ya que la piel que se toma es mínima y de lugares no visibles.
2. No crea un trauma en el paciente por lo cual no genera dolor.
3. No tiene problemas de rechazo inmunológico ya que los tejidos usados son del mismo paciente.
4. No es requisito realizar el procedimiento en cirugía.
5. El proceso puede ser manejado por enfermeras y médicos de cualquier especialidad.
6. No es necesario que el hospital donde se esta tratando al paciente adquiera los materiales especiales de toma de piel (llamado Dermatomo), y las cuchillas para el mismo, las cuales son de alto costo ya que son de un solo uso. Estos productos son suministrados por nosotros en nuestro laboratorio.
7. El costo de producción es un 80% más económico que el de la piel de cadáver y los resultados estéticos mucho mejores.

8. El costo de producción y distribución es 50% mas bajo que el costo de un procedimiento quirúrgico para un área de 20 x 20 cm.

Es un proceso que, con un entrenamiento básico, es replicable en cualquier lugar del mundo, incluidos países en vía de desarrollo, ya que todos los materiales utilizados son los de uso básico de cualquier laboratorio.

A continuación se presenta un breve análisis comparativo que muestra el estado de la técnica en varias modalidades frente a la presente invención. Dicho análisis tiene como objetivo destacar las ventajas de la presente invención las cuales le conceden las características necesarias para el otorgamiento de la patente solicitada.

Existe una gran multitud de documentación que muestra el estado de la técnica en donde se detallan los procesos utilizados y en base a esos documentos que se citan a continuación se puede hacer la comparación detallada de dichos procesos frente al proceso de la presente invención y llegar a las conclusiones expuestas arriba en este documento. Dichas referencias se dan más adelante, las cuales pueden ser consultadas.

Desde hace varios años se vienen desarrollando diferentes métodos de cultivos celular para cobertura de áreas cruentas de piel y/o sustitutos cutáneos, la novedad en nuestro producto es que es producido de células autólogas con suero del paciente (Autólogo), logrando capas de piel en tres días. Entre los otros métodos encontramos:

1. SUSTITUTOS DE PIEL, HSE (HUMAN SKIN EQUIVALENT)

A. CULTIVO DE CELULAS DE DONANTE O CADAVER

Este método se diferencia del desarrollado por nosotros ya que se toman muestras o porciones de piel de cadáveres o donantes y mediante un proceso de criogenización y preservación que requiere de múltiples químicos y compuestos, almacenan porciones de piel congelados para luego ser aplicados a los pacientes que lo requieren. Esto necesita estudios inmunológicos tanto del donante como del paciente para disminuir el riesgo de rechazo. Las diferencias principales son:

NUESTRO PRODUCTO	CULTIVOS DE DONANTE O CADÁVER
Células del mismo paciente	Piel de donante o cadáver
Suero Autólogo	Suero fetal Bovino y glicerol y Dimetil Sulfoxido
Suero Autólogo	Factores de crecimiento, Insulina, Interleuquinas, Trombina
Cobertura definitiva	Apósito temporal

No requiere mas procedimientos	Requiere Injertos de pie adicional
Se obtiene en 3 días	Esta almacenado y listo
No requiere exámenes de laboratorio adicionales	Requiere pruebas inmunológicas, anti CMV y Anti HTLV1, Hepatitis B, VHI, Serología, Pruebas renales y Hepáticas, y cultivos bacteriológicos de la piel.
No transmite enfermedades	Puede transmitir enfermedades
No se necesitan donantes	Se necesitan donantes
No se necesitan donantes	Donantes menores de 75 años y tiempo de muerto menor a 6 horas
La extracción de la piel se realiza en cualquier habitación	La extracción de la piel es en habiente estéril
Requiere almacenamiento en nevera convencional a -4°C	Almacenamiento en congelador a -80°C
	Requiere criopreservación
No requiere ningún proceso especial en el momento de aplicación	Se debe descongelar y lavar en suero previo a la aplicación
Bajo Costo	Alto Costo
NO hay rechazo	Hay Rechazo Siempre

B. COMPUESTOS BASADOS EN COLAGENO SINTETICO Y ANALOGOS DERMICOS SINTETICOS

Proceso completamente diferente al nuestro ya que son apósitos temporales (no definitivos) producidos de compuestos sintéticos y/o de animales. NO toman células ni suero de seres humanos. Se almacenan y están disponibles inmediatamente a diferentes costos y nombres comerciales en el mercado. Entre estos encontramos a Biobrane, Transyte, Integra, Alloderm, Allograf., Apligraf y Dermalogen.

2. CULTIVOS CELULARES DE QUERATINOCITOS

Los cultivos celulares se han ido desarrollando desde hace 3 décadas y en la actualidad es incluso posible cultivar células dérmicas a partir de células madre, así que las células dérmicas se pueden producir muy fácilmente. Las diferencias más marcadas con los otros métodos de cultivo celular es que nosotros logramos tener un apósito del tamaño requerido en 3 días con una confluencia de queratinocitos suficiente para cubrir áreas cruentas mientras los otros métodos se toman por lo menos 3 semanas en el caso de los cultivos de queratinocitos autólogos.

Adicionalmente nuestro método no requiere donante ni estudios adicionales ya que usamos tanto células como suero del mismo paciente, cosa que ninguno de los otros métodos hace.

NUESTRO PRODUCTO	QUERATINOCITOS HETEROLOGOS	QUERATINOCITOS AUTOLOGOS
Células del mismo paciente	Células de donante	Células del mismo paciente
Suero Autólogo	Suero fetal Bovino	Suero fetal Bovino
Suero Autólogo	Factores de crecimiento,	Factores de crecimiento,

	Insulina, Interleucinas, Trombina	Insulina, Interleucinas, Trombina
Cobertura definitiva	En ocasiones pueden requerir Injerto piel	En ocasiones pueden requerir Injerto piel
No requiere mas procedimientos	En ocasiones pueden requerir Injerto piel	En ocasiones pueden requerir Injerto piel
Se obtiene en 3 días	Se obtiene entre 3-4 semanas	Se obtiene entre 3-4 semanas
No requiere exámenes de laboratorio adicionales	Requiere pruebas inmunológicas, anti CMV y Anti HTLV1, Anticuerpos Monoclonales, Hepatitis B, VHI, Serología, Pruebas renales y Hepáticas, y cultivos bacteriológicos de la piel.	Requiere cultivos Bacteriológicos.
No transmite enfermedades	Puede transmitir Enfermedades	No transmite enfermedades
No se necesitan donantes	Se necesitan donantes	No se necesitan donantes
No hay rechazo	Puede haber Rechazo	No hay Rechazo

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kultiviert keratinozyten: gestern-heute. Bettina Bierbocks, k. Pickl-herk, r. Soller, gs bayer, g. Meissl, m frey.
2. Estandarizacion de un metodo de cultivo de queratinocitos primarios y su co cultivo con fibroblastos en mallas de colageno i. Posada maria mercedes, fontanilla marta raquel.
3. Kolf, c.m.; cho, e.; tuan, r.s. 2007. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. In: <http://arthritis-research.com/content/9/1/204>. Consulted: october 29th, 2007
4. Myers, s.r.; leigh, i.m.; navsaria, h. 2007. Epidermal repair results from activation of follicular and epidermal progenitor keratinocytes mediated by a growth factor cascade. Wound rep. Reg. 15, 693-701.
5. Staiano-coico, l; higgins, p.j.; darzynkiewicz, z.; kimmel, m.; gottlieb, a.b.; pagan-charry, i.; madden, m.r.; finkestein, j.l.; hefton, j.m. 1986. Human keratinocyte culture: identification and staging of epidermal cell subpopulations. J. Clin. Invest. 77, february, 396-404.
6. Jiao, xiang-yang m.d.; tanczos, eszter m.d.; dodic, tom; voigt, mathias m.d.; haberstroh, joerg vet. M.d.; stark, g. Bjorn m.d. prefabrication of bilaminar-

- epithelialized composite flap with tissue expander and cultured keratinocytes. *Plastic & reconstructive surgery*. 103(1):138-144, january 1999.
7. Kangesu, thirloshan m.s., f.r.c.s.(plast.); manek, sanjiv m.r.c.path.; terenghi, giorgio ph.d.; gu, xu-hong b.sc.; navsaria, harshad a. M.sc. Nerve and blood vessel growth in response to grafted dermis and cultured keratinocytes. *Plastic & reconstructive surgery*. 101(4):1029-1038, april 1998.
 8. Pandya, a. N. M.s., m.ch.(plast.), dip.nat.board (gen.) (plast.), f.r.c.s.(edin.), f.r.c.s.(glas.); woodward, b. Ph.d.; parkhouse, n. D.m. the use of cultured autologous keratinocytes with integra in the resurfacing of acute burns. *Plastic & reconstructive surgery*. 102(3):825-828, september 1998.
 9. Magnusson, mark f.r.a.c.s.(plast.); papini, remo p. F.r.c.s.(plast.); rea, suzzane m. F.r.c.s.i.(plast.); reed, chris c. B.sc.(eng.); wood, fiona m. Cultured autologous keratinocytes in suspension accelerate epithelial maturation in an in vivo wound model as measured by surface electrical capacitance. *Plastic & reconstructive surgery*. 119(2):495-499, february 2007.
 10. Simman, richard m.d.; talisman, ran m.d.; soroff, harry s. M.d.; hatch, gabriele a.b.; simon, marcia ph.d. cultured palmar keratinocytes after auto-engraftment to plantar surface maintain site and function specificity. *Plastic & reconstructive surgery*. 104(1):175-179, july 1999.
 11. Butler, charles e. M.d.; orgill, dennis p. M.d., ph.d.; yannas, ioannis v. Ph.d.; compton, carolyn c. M.d., ph.d. effect of keratinocyte seeding of collagen-glycosaminoglycan membranes on the regeneration of skin in a porcine model. *Plastic & reconstructive surgery*. 101(6):1572-1579, may 1998.
 12. imaizumi f, asahina i, moriyama t, ishii m, omura k. Cultured mucosal cell sheet with a double layer of keratinocytes and fibroblasts on a collagen membrane. *Tissue eng*. 2004 may-jun;10(5-6):657-64.
 13. Smirnov sv, Kiselev iv, Rogovaya os, Vasil'ev av, terskikh vv. Skin repair by transplantation of cultured keratinocytes. *Bull exp biol med*. 2003 jun;135(6):608-9.
 14. Voigt m, Schauer m, Schaefer dj, andree c, horch r, stark gb. Cultured epidermal keratinocytes on a microspherical transport system are feasible to reconstitute the epidermis in full-thickness wounds. *Tissue eng*. 1999 dec;5(6):563-72.

15. Bell e, Sher s, Hull b, Merrill c, Rosen s, Chamson a, asselineau d, dubertret l, coulomb b, lapiere c, nusgens b, neveux y. The reconstitution of living skin. *J invest dermatol.* 1983 jul;81(1 suppl):2s-10s

16. A.w.c. chua, d.r. ma, i.c. song, t.t. phan, s.t. lee and c. Song in vitro evaluation of fibrin mat and tegaderm™ wound dressing for the delivery of keratinocytes—implications of their use to treat burns *burns, in press, corrected proof, available online 29 october 2007*

17. Bishara s. Atiyeh and michel costagliola cultured epithelial autograft (cea) in burn treatment: three decades later *burns, volume 33, issue 4, june 2007, pages 405-413*

18. D.d. lozano the effect of a fibroblast derived skin substitute on keratinocyte proliferation *burns, volume 33, issue 1, supplement 1, february 2007, pages s62-s63*

19. Matthias rab, rupert koller, margot ruzicka, gudrun burda, lars peter kamolz, bettina bieroachs, guenther meissl and manfred frey . Should dermal scald burns in children be covered with autologous skin grafts or with allogeneic cultivated keratinocytes?—“the viennese concept” *burns, volume 31, issue 5, august 2005, pages 578-586*

20. L.p. kamolz, m. Luegmair, n. Wick, b. Eisenbock, s. Burjak, r. Koller, g. Meissl and m. Frey .the viennese culture method: cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on fibroblast containing fibrin glue gels *burns, volume 31, issue 1, february 2005, pages 25-29*

21. C. -j. Gustafson and g. Kratz. Cultured autologous keratinocytes on a cell-free dermis in the treatment of full-thickness wounds. *Burns, volume 25, issue 4, june 1999, pages 331-335*

22. J. E. Paddle-ledinek, d. G. Cruickshank and j. P. Masterton. Skin replacement by cultured keratinocyte grafts: an australian experience *burns, volume 23, issue 3, may 1997, pages 204-211*

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1** muestra una fotografía de la separación de la piel después de la digestión.
- La figura 2** es una vista de la monocapa de queratinocitos a las 96 horas de crecimiento.
- La figura 3** muestra los queratinocitos sobre fibroblastos
- La figura 4** muestra como se ven los apósitos de colágeno con fibroblastos y queratinocitos.
- La figura 5** muestra el estado del cultivo de queratinocitos y fibroblastos con suero autólogo del paciente colocados sobre la malla de colágeno. Se puede observar la adecuada confluencia y adhesión celular.
- La figura 6** muestra un paciente de 56 años con quemadura de segundo grado en abdomen que fue manejado con el producto de la presente invención, mostrando epitelización completa al quinto día.
- Las figuras 7 A-D** muestra un paciente con quemadura en antebrazo manejado con el producto obtenido mediante el proceso de la presente invención. En 7C se puede notar el aspecto del apósito al tercer día adherido y como se desprende a medida que la epitelización avanza hasta desprenderse por completo con el cierre completo de la herida según se muestra en 7D.
- Las figuras 8A-D** muestran la evolución de un paciente con quemadura de segundo grado profundo superficial y profundo del miembro superior con área cruenta residual en el brazo tratado con el producto obtenido mediante el proceso de la presente invención.
- Las figuras 9A-D** muestran la evolución de un paciente de 10 años con una quemadura en el dorso del pie derecho que ha sido tratado con el producto obtenido mediante el proceso de la presente invención. El seguimiento de 6 meses muestra una cicatriz plana, levemente pigmentada peri sin induración (Fig. 9D).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención está relacionada con un proceso la formación de piel para fabricar apósitos o parches utilizados para curar, cicatrizar, aliviar quemaduras graves en pacientes. Dicho proceso se describe a continuación con base en una modalidad ilustrativa cuyo único fin es el de explicar la invención para ser comprendida en su alcance y espíritu. Debe entenderse que numerosas variaciones pueden lograrse por aquellos versados en la técnica, las cuales caen dentro del alcance y espíritu de la presente invención. Dicho alcance está solo determinado por las reivindicaciones adjuntas.

El proceso en general se basa en la toma de una muestra de piel y una muestra de sangre del paciente y en base a estos dos elementos se cultiva la piel, la cual es colocada sobre un parche de colágeno para producir un apósito que posteriormente se coloca sobre un paciente que lo requiera. Dicho proceso comprende dos subprocesos que se pueden realizar de manera simultánea o sucesiva, aunque se prefiere la manera simultánea de llevar a cabo los subprocesos. Un subproceso se inicia en la etapa 10 para el tratamiento de la piel superficial y el otro sub proceso se inicia simultáneamente o a continuación en la etapa 10'. Así, el proceso de la invención se describe por las siguientes etapas:

I - *Día 0:

A -Toma de muestra de piel y de sangre autologos.

1. Obtener del paciente una muestra de piel, que tiene un área entre 2 mm^2 y 4 mm^2 , preferiblemente 3 mm^2 y un espesor entre $0,30 \text{ mm}$ a $0,65 \text{ mm}$,
2. Obtener una muestra de sangre de $20 -50 \text{ cm}^3$ de la persona que requiere la piel (autologa).

B -Digestión de la piel (18 horas)

3. Lavar muestra de piel obtenida con, entre 2 cm^3 y 10 cm^3 de solución amortiguadora de fosfato (PBS).
4. Colocar la muestra de piel autóloga en una solución de Tripsina al 0.25% por 18 horas a 4° C .

C -Obtención de suero autólogo a partir de la sangre del paciente

5. Centrifugar la muestra de sangre autóloga durante 10 minutos a 1200 rpm obteniendo entre 10 cm³ a 25 cm³ de plasma.
6. Almacenar dicho plasma a 4° C.
7. Inactivar la Tripsina aplicada mediante la adición de 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa), 2 cm³ a 5 cm³ de solución amortiguadora de fosfato (PBS) y 0,5 cm³ a 2 cm³ de 10,000 U.I. de Penicilina, 10 mg de Estreptomicina Sulfato y 25/-1.g de Anfoterisina B.

II - *Día 1:

D -Separación de las dos capas de la piel autóloga. (Ver figura 1)

8. Separar luego la piel autóloga en dos capas (explantes) mediante la ayuda de pinzas: una capa superficial de epidermis y una profunda de dermis que contiene fibras de colágeno.
9. Lavar los explantes (las 2 capas de piel) por separado repetidamente (entre 3 y 10 veces) con ***;

E -Cultivo y replicación de queratinocitos en suero autólogo (72 hrs) obtenidos a partir de la capa superficial de la piel autóloga obtenida después de la digestión.

10. Recoger la porción superficial de la piel en un tubo estéril;
11. centrifugar dicho tubo por 10 minutos a 1200 rpm.
12. Descartar el sobrenadante;
13. Resuspender el botón de células resultante en de 5 cm³ a 10 cm³ de medio DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa).
14. Sembrar las células contenidas en este líquidos a una densidad de 75.000 a 90.000 células/cm² en cajas estériles;
15. Verificar la densidad celular mediante conteo celular en cámara de Neubauer;
16. Almacenar las células (queratinocitos) sembradas a 37°C durante 24 horas.

F -Cultivo y replicación de Fibroblastos autólogos obtenidos a partir de la capa profunda que resulta después de la digestión.

- 10' a continuación de la etapa 9, sembrar la porción profunda de la piel autóloga obtenida después de la digestión en una caja estéril;

11' Adicionar de 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glusosa) y de 2 cm³ a 5 cm³ de plasma obtenido de la sangre de la persona que requiere la piel;

12' Almacenar lo resultante a 37° C durante 48 horas para permitir el crecimiento de fibroblastos.

13' A las 48 horas de sembrados y almacenados los fibroblastos se extraen y se colocan en un tubo estéril;

14' Centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm dicho tubo;

15' Descartar el sobrenadante;

16' Adicionar al botón celular 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glusosa) y de 2 cm³ a 5 cm³ de plasma autólogo obtenido de la sangre de la persona que requiere la piel.

III - *Día 2:

G -Cambio de medio de cultivo de los queratinocitos autólogos.

17. Extraer el liquido o medio de cultivo a las 24 horas de almacenado el cultivo de queratinocitos;

18. Aplicar nuevamente de 2 cm³ a 5 cm³ de medio DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa) mas 1 cm³ a 10 cm³ de plasma Autólogo (resultante de la sangre del paciente);

19. Almacenar nuevamente por 24 horas a 37° C. (Ver Figura 2)

IV - *Día 3:

H - Siembra de los Fibroblastos cultivados sobre una malla de colágeno.

20. sembrar el producto obtenido en la etapa 16' sobre una malla de colágeno del tamaño requerido;

21. Verificar que los fibroblastos autólogos queden a 90% de confluencia;

22. Colocar esta malla sobre una tabla oscilante durante un minino de 4 horas;

23. Almacenar nuevamente a 37°C durante mínimo 20 horas;

I - Siembra de los queratinocitos cultivados sobre los fibroblastos y la malla de colágeno (24hrs) (Ver figura 3)

24. Después de 24 horas de haber cambiado el medio y almacenado los queratinocitos se procede a despegarlos de la caja empleando de 2 cm³ a 10 cm³ de solución amortiguadora de fosfato (PBS);
25. Colocar este líquido con las células en un tubo estéril y centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm.
26. Descartar el sobrenadante resultante de la centrifugación;
27. resuspender el botón celular en 5 cm³ a 10 cm³ del plasma autólogo.
28. Sembrar los queratinocitos sumergidos en el plasma sobre los fibroblastos y la malla de colágeno verificando que se encuentren a una densidad de 250.000 células/cm²;
28. almacenar las células sembradas a 37° C durante otras 24 horas;
29. Observar después de este tiempo la confluencia y adhesión celular sobre los apósitos de colágeno para obtener una adecuada capa de piel de tejido autólogo.
(Ver figuras 4 y 5)

V - *Día 4:

- J - Entrega del apósito de piel para ser colocada sobre la persona que lo requiere.

Resumen del proceso de acuerdo con la invención

I - *Día 0:

- A -Toma de muestra de piel y de sangre autólogos.
- B -Digestión de la piel (18 h)
- C -Obtención de suero autólogo a partir de la sangre del paciente

II - *Día 1:

- D -Separación de las dos capas de la piel autóloga.
- E -Cultivo y replicación de queratinocitos en suero autólogo (72 h) obtenidos a partir de la capa superficial de la piel autóloga obtenida después de la digestión.
- F -Cultivo y replicación de Fibroblastos autólogos obtenidos a partir de la capa profunda que resulta después de la digestión.

III - *Día 2:

- G -Cambio de medio de cultivo de los queratinocitos autólogos.

IV - *Día 3:

H -Siembra de los Fibroblastos cultivados sobre una malla de colágeno.

I -Siembra de los queratinocitos cultivados sobre los fibroblastos y la malla de colágeno (24h)

V - *Día 4:

J – Obtención del producto final como un parche o apósito de capa de piel para ser colocada sobre la persona que lo requiere.

El resultado de la aplicación del proceso descrito de la presente solicitud de patente es un parche o apósito conformado con piel creada sobre un sustrato de colágeno sobre malla. Dicho producto se aplica directamente sobre el sitio del paciente que tiene daño en la piel por quemadura y se permite la generación de piel sobre la herida del paciente de una forma limpia y rápida obteniéndose resultados como los que se describen en los ejemplos que siguen y en las figuras 6 a 9.

EJEMPLOS DE APLICACIÓN Y DESARROLLO DE LA INVENCION EN CASOS REALES

Se manejaron entonces de esta manera 10 pacientes con áreas cruentas cutáneas de la siguiente manera. Se realizo un lavado inicial más desbridamiento del área cruenta, momento en el cual se tomo una muestra de piel sana de 3 mm de longitud y se extrajeron 20 cm³ de sangre. Esto se llevo al laboratorio y se realizo el proceso anteriormente descrito.

A los tres días de la toma de la muestra ya se cuenta con un apósito con fibroblastos y queratinocitos con una densidad celular adecuada listo para ser colocado (Fig 5). Se realiza un nuevo lavado del área cruenta y se pone el apósito cubriéndose este con gasas y un apósito transparente. Se realiza destape al quinto día encontrando epitelización completa en todos los pacientes tratados (Fig 8 y 9).

Se realizo seguimiento fotográfico de los pacientes encontrando que el área tratada con los queratinocitos autólogos presentaba una cicatriz de mejor calidad, sin induración y sin retracciones, mientras que las áreas que cicatrizaron por segunda intención y con curaciones presentaba hipertrofia de la cicatriz (Fig 6 y 7).

CONCLUSIONES DE LOS EJEMPLOS Y RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA INVENCION

Los pacientes con áreas cruentas cutáneas han sido manejados a través de la historia mediante diferentes métodos y en la actualidad existen diferentes opciones de tratamiento que van desde el cierre por segunda intención hasta los cultivos celulares heterólogos. En el mundo se han desarrollado los cultivos de queratinocitos heterólogos y esta estandarizado el método para el cultivo de los mismos, pero estos requieren estudios inmunológicos al tratarse de células extrañas al huésped receptor.

Ante esta dificultad desarrollamos y estandarizamos un método que permite de una muestra muy pequeña de piel obtener apósitos con queratinocitos y suero autólogo en tres días, con lo que se logra epitelización completa al 5to día, siendo esta cicatriz diferente a la que presentan estos pacientes con injertos de piel o con cierre por segunda intención ya que no presenta contracción o retracción y ofrece una alternativa viable para el manejo de áreas cruentas sin cicatrices adicionales de las áreas donantes de injertos.

La presente invención ha sido descrita mediante una modalidad ilustrativa de la misma. Debe entenderse que dicha descripción debe leerse como no limitativa de la invención, ya que cualquier persona versada en la técnica puede introducir cambios y modificaciones que no se salen del alcance y espíritu de la invención, el cual solo está definido por el tenor de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

Un proceso para generar un parche o apósito con piel caracterizado por que comprende las etapas de:

I - *Día 0:

- A -Toma de muestra de piel y de sangre autólogos.
- B -Digestión de la piel durante 18 h
- C -Obtención de suero autólogo a partir de la sangre del paciente

II - *Día 1:

- D -Separación de las dos capas de la piel autóloga.
- E -Cultivo y replicación de queratinocitos en suero autólogo durante 72 h obtenidos a partir de la capa superficial de la piel autóloga obtenida después de la digestión.
- F -Cultivo y replicación de Fibroblastos autólogos obtenidos a partir de la capa profunda que resulta después de la digestión.

III - *Día 2:

- G -Cambio de medio de cultivo de los queratinocitos autólogos.

IV - *Día 3:

- H -Siembra de los Fibroblastos cultivados sobre una malla de colágeno.
- I -Siembra de los queratinocitos cultivados sobre los fibroblastos y la malla de colágeno durante 24h

V - *Día 4:

- J – Obtención del producto final como un parche o apósito de capa de piel para ser colocada sobre la persona que lo requiere.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa I – A comprende las etapas:

1. Obtener del paciente una muestra de piel, que tiene un área entre 2 mm² y 4 mm², preferiblemente 3 mm² y un espesor entre 0,30 mm a 0,65mm,
 2. Obtener una muestra de sangre de 20 -50 cm³ de la persona que requiere la piel (autologa).
3. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la etapa I – B comprende las etapas:
3. Lavar muestra de piel obtenida con, entre 2 cm³ y 10 cm³ de solución amortiguadora de fosfato (PBS).
 4. Colocar la muestra de piel autóloga en una solución de Tripsina al 0.25% por 18 horas a 4° C.
4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – C comprende las etapas:
5. Centrifugar la muestra de sangre autóloga durante 10 minutos a 1200 rpm obteniendo entre 10 cm³ a 25 cm³ de plasma.
 6. Almacenar dicho plasma a 4° C.
 7. Inactivar la Tripsina aplicada mediante la adición de 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa), 2 cm³ a 5 cm³ de solución amortiguadora de fosfato (PBS) y 0,5 cm³ a 2 cm³ de 10,000 U.I. de Penicilina, 10 mg de Estreptomicina Sulfato y 25/-1.g de Anfoterisina B.
5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – D comprende las etapas:
8. Separar luego la piel autóloga en dos capas (explantes) mediante la ayuda de pinzas: una capa superficial de epidermis y una profunda de dermis que contiene fibras de colágeno.
 9. Lavar los explantes (las 2 capas de piel) por separado repetidamente (entre 3 y 10 veces) con ***;
6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – E comprende las etapas:
10. Recoger la porción superficial de la piel en un tubo estéril;

11. centrifugar dicho tubo por 10 minutos a 1200 rpm.
12. Descartar el sobrenadante;
13. Resuspender el botón de células resultante en de 5 cm³ a 10 cm³ de medio DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa).
14. Sembrar las células contenidas en este líquidos a una densidad de 75.000 a 90.000 células/cm² en cajas estériles;
15. Verificar la densidad celular mediante conteo celular en cámara de Neubauer;
16. Almacenar las células (queratinocitos) sembradas a 37°C durante 24 horas.

7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – F comprende las etapas:

- 10' a continuación de la etapa 9, sembrar la porción profunda de la piel autóloga obtenida después de la digestión en una caja estéril;
- 11' Adicionar de 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glusosa) y de 2 cm³ a 5 cm³ de plasma obtenido de la sangre de la persona que requiere la piel;
- 12' Almacenar lo resultante a 37° C durante 48 horas para permitir el crecimiento de fibroblastos.
- 13' A las 48 horas de sembrados y almacenados los fibroblastos se extraen y se colocan en un tubo estéril;
- 14' Centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm dicho tubo;
- 15' Descartar el sobrenadante;
- 16' Adicionar al botón celular 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glusosa) y de 2 cm³ a 5 cm³ de plasma autólogo obtenido de la sangre de la persona que requiere la piel.

8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – G comprende las etapas:

17. Extraer el líquido o medio de cultivo a las 24 horas de almacenado el cultivo de queratinocitos;
18. Aplicar nuevamente de 2 cm³ a 5 cm³ de medio DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa) mas 1 cm³ a 10 cm³ de plasma Autólogo (resultante de la sangre del paciente);
19. Almacenar nuevamente por 24 horas a 37° C. (Ver Figura 2)

9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – H comprende las etapas:

- 20. sembrar el producto obtenido en la etapa 16' sobre una malla de colágeno del tamaño requerido;
- 21. Verificar que los fibroblastos autólogos queden a 90% de confluencia;
- 22. Colocar esta malla sobre una tabla oscilante durante un mínimo de 4 horas;
- 23. Almacenar nuevamente a 37°C durante mínimo 20 horas;

10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – I comprende las etapas:

- 24. Después de 24 horas de haber cambiado el medio y almacenado los queratinocitos se procede a despegarlos de la caja empleando de 2 cm³ a 10 cm³ de solución amortiguadora de fosfato (PBS);
- 25. Colocar este líquido con las células en un tubo estéril y centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm.
- 26. Descartar el sobrenadante resultante de la centrifugación;
- 27. resuspender el botón celular en 5 cm³ a 10 cm³ del plasma autólogo.
- 28. Sembrar los queratinocitos sumergidos en el plasma sobre los fibroblastos y la malla de colágeno verificando que se encuentren a una densidad de 250.000 células/cm²;
- 28. almacenar las células sembradas a 37° C durante otras 24 horas;
- 29. Observar después de este tiempo la confluencia y adhesión celular sobre los apósitos de colágeno para obtener una adecuada capa de piel de tejido autólogo. (Ver figuras 4 y 5)

11. Un parche o apósito caracterizado porque comprende un sustrato de malla sobre la cual se ha colocado colágeno, encima queratinocitos y encima fibroblastos.

12. El parche o apósito de acuerdo con la reivindicación 11 caracterizado porque dichos queratinocitos y fibroblastos fueron producidos por el método de las reivindicaciones 1 a 10.



Fig 1. Separación de la piel después de la digestión

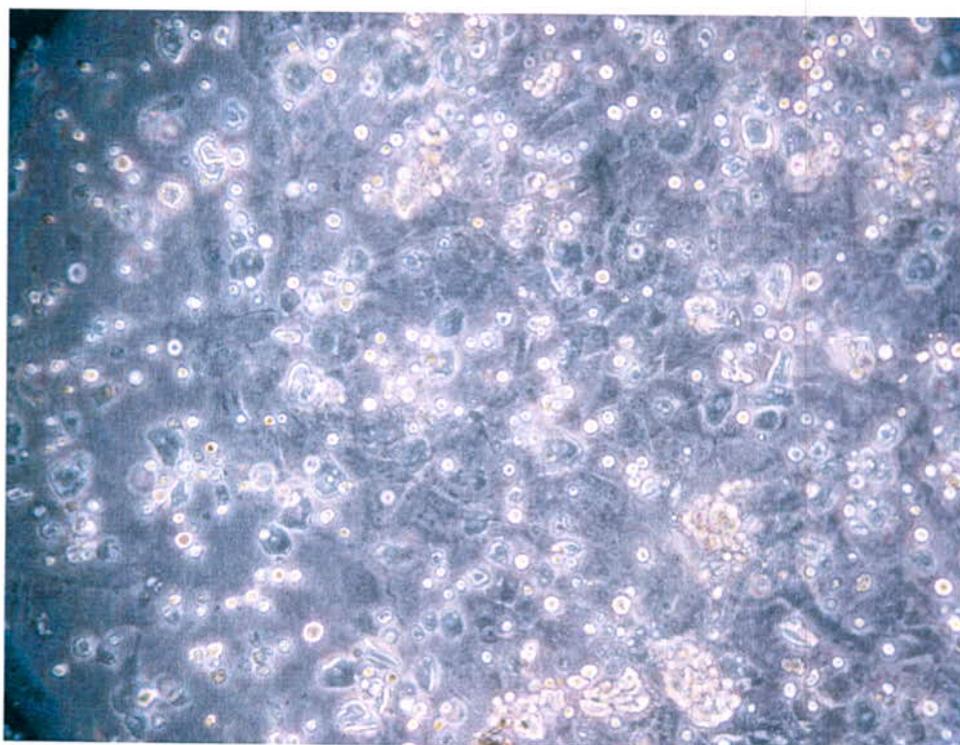


Figura 2. Monocapa de Queratinocitos a 96 horas de crecimiento

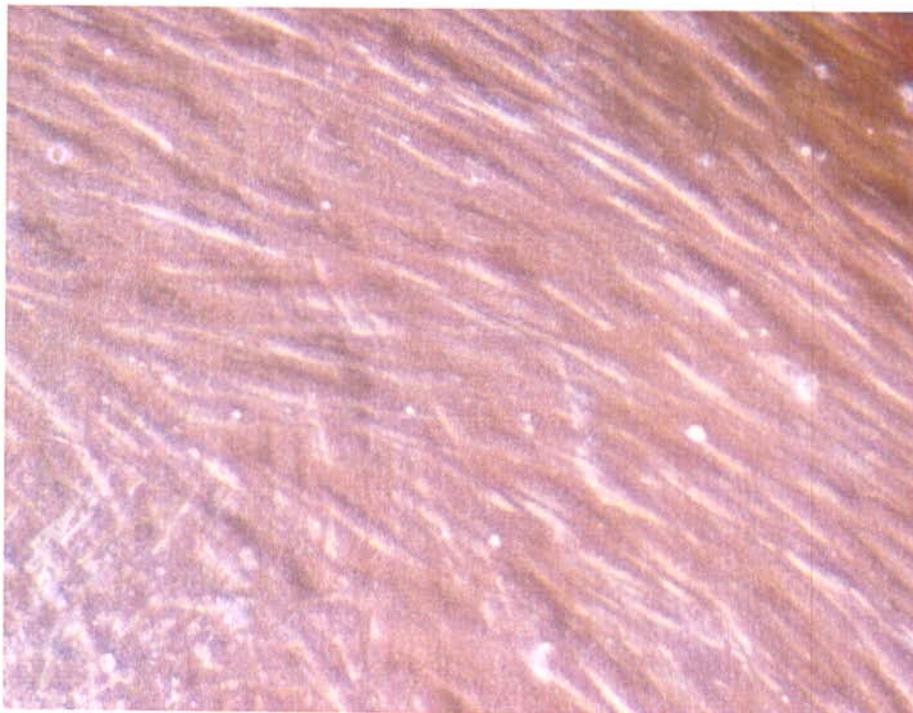


Figura 3. Queratinocitos sobre fibroblastos

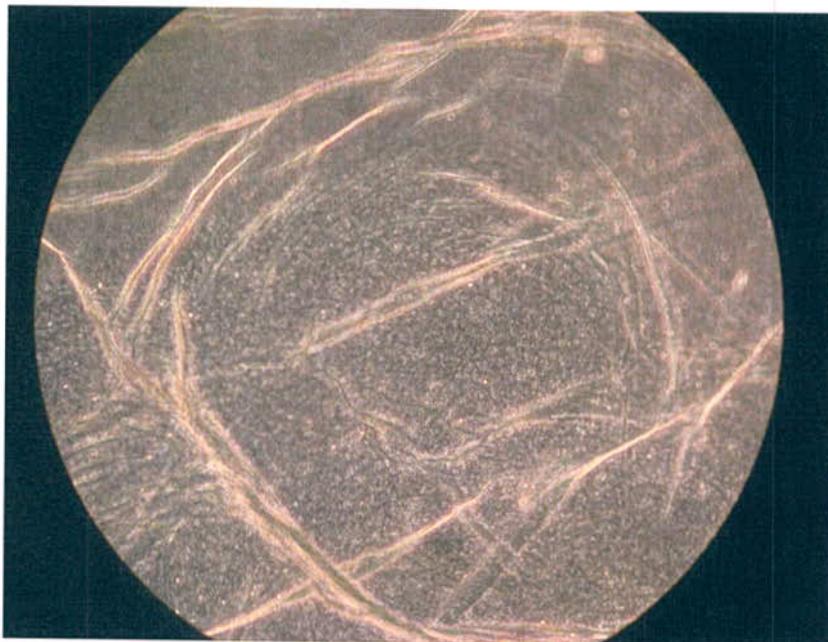
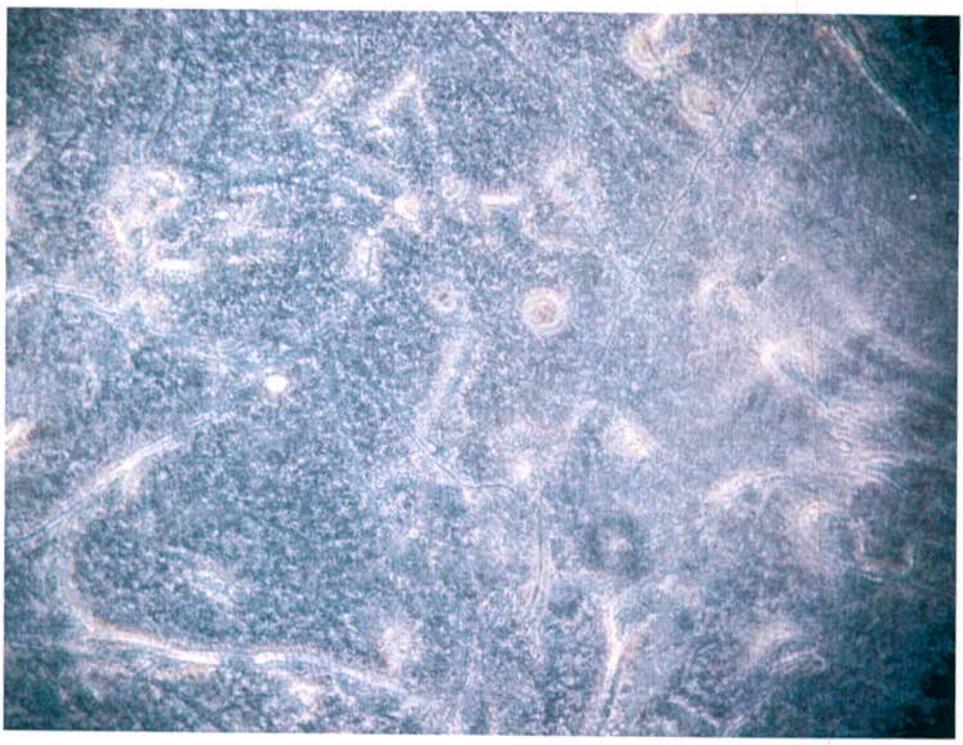


Fig 4. Apósitos de colágeno con fibroblastos y queratinocitos



● Fig 5. Estado del cultivo de queratinocitos y fibroblastos con suero autólogo del paciente sobre la malla de colágeno. Observamos la adecuada confluencia y adhesión celular.



● Fig 6. Paciente de 56 años con quemadura de segundo grado en abdomen que fue manejado con cultivo de queratinocitos autólogos, mostrando epitelización completa al 5to día.



Fig 7. Paciente con quemadura en antebrazo manejado con los queratinocitos cultivados. Nótese (C) el aspecto del apósito al 3er día adherido y como se desprende a medida que la epitelización avanza hasta despegarse por completo con cierre completo de la herida (D).



Fig 8. (A) Paciente con quemadura de segundo grado profundo superficial y profundo del miembro superior derecho con área cruenta residual en el brazo (B) Área cruenta residual cubierta con los apósitos (C) Epitelización completa al 5to día. Nótese que la zona que cicatrizo por segunda intención presenta una cicatriz hipertrófica (D) Área manejada con los apósitos, la cual presenta una cicatriz plana no indurada a los 7 meses después del tratamiento.



Fig 9. (A) Paciente de 10 años con una quemadura en el dorso del pie derecho. (B) Se cubre con un apósito con queratinocitos autólogos (C) Destape al 5to día mostrando epitelización adecuada. (D) Seguimiento 6 meses mostrando una cicatriz plana, levemente pigmentada pero sin induración.

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/144956 A1

(43) Fecha de publicación internacional
24 de noviembre de 2011 (24.11.2011)

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 5/071 (2010.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/IB2010/001215
- (22) Fecha de presentación internacional:
21 de mayo de 2010 (21.05.2010)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **SOTO PAREJA, Rodrigo Foción** [CO/CO];
Transversal 5 N° 87 31, Ap 202, 10 Bogota (CO).
- (72) Inventores; e
- (71) Solicitantes : **ZAMBRANO BURGL, Juan Carlos** [CO/CO]; Carrera 7 N° 127A 69, Ap 505, 10 Bogotá (CO). **GAONA SILVA, Jennifer Cristina** [CO/CO]; Carrera 7 N° 127A 69, Ap 505, 10 Bogota (CO).
- (74) Mandatario: **MENDEZ, Jesus**; Wolf Mendez Abogados, Calle 83A N° 23-90, 8 Bogotá (CO).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF PATCHES OR DRESSINGS OF AUTOLOGOUS SKIN THROUGH CULTIVATION OF AUTOLOGOUS KERATINOCYTES AND FIBROBLASTS WITH AUTOLOGOUS SERUM FOR THE GENERATION OF SKIN

(54) Título : PROCESO PARA LA PRODUCCION DE PARCHES O APOSITOS DE PIEL AUTOLOGA MEDIANTE CULTIVO DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS AUTOLOGOS CON SUERO AUTOLOGO PARA GENERACION DE PIEL

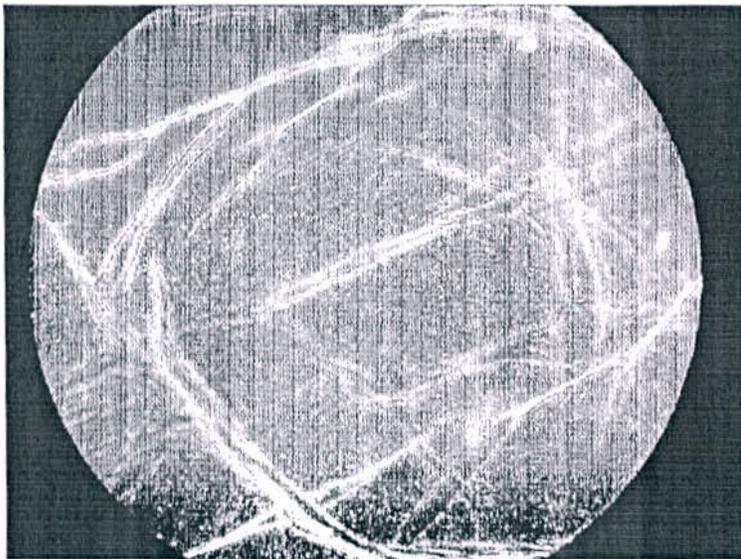


Fig 4. Apósitos de colágeno con fibroblastos y queratinocitos AA

AA... Collagen dressings with fibroblasts and keratinocytes

(57) Abstract: The process in general is based on taking a sample of skin and a sample of blood from the patient and based on these two elements skin is cultured, being placed on a collagen patch to produce a dressing which is subsequently placed on the patient requiring it.

(57) Resumen: El proceso en general se basa en la toma de una muestra de piel y una muestra de sangre del paciente y en base a estos dos elementos se cultiva la piel, la cual es colocada sobre un parche de colágeno para producir un aposito que posteriormente se coloca sobre un paciente que lo requiera.

WO 2011/144956 A1

**PROCESO PARA LA PRODUCCION DE PARCHES O APÓSITOS
DE PIEL AUTOLOGA MEDIANTE CULTIVO DE
QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS AUTOLOGOS CON
SUERO AUTÓLOGO PARA GENERACION DE PIEL**

Campo Técnico

La presente invención está relacionada con un proceso de formación de apósitos o parches de piel para cubrir, curar, cicatrizar, aliviar pérdidas cutáneas en pacientes. En particular se refiere a un proceso para generar piel que se lleva a cabo en un laboratorio.

Antecedentes de la invención

En la actualidad las quemaduras profundas, así como otras pérdidas de tejido cutáneo por diferentes traumas o enfermedades, causan lesiones a la piel que requieren manejo con cobertura de estas áreas. Esta cobertura se realiza actualmente con injertos de piel que se toman directamente de piel del mismo paciente. El procedimiento, aunque muy efectivo, genera una cicatriz importante en el área donde se toma el injerto (muslos espalda, glúteos) (Foto 1). Adicionalmente este procedimiento se debe realizar en cirugía con anestesia general o regional lo cual trae complicaciones inertes a cualquier procedimiento quirúrgico tales como: dolor severo, infección, sangrado, requerimiento de reintervenciones y, aunque en muy bajo porcentaje, la muerte. Además, económicamente también genera gastos adicionales como la hospitalización, analgésicos, consultas para curaciones, tratamientos para las cicatrices del área donante, materiales especiales para la cirugía y traslado de pacientes a hospitales de mayor complejidad, entre otros.

Las avulsiones de la piel causan lesiones al tejido epitelial cutáneo causando una pérdida de células, siendo reemplazadas por una matriz fibrosa producida por fibroblastos que actúan como capa alimentadora en condiciones *in vivo*. Existen diversos reportes de cultivo de queratinocitos en la construcción de parches regenerativos de piel, todos estos reportes son con células tomadas de donantes o de

CONFIRMATION COPY

34

cadáveres (heterólogo), lo que implica realizar múltiples estudios tanto al donante como al receptor, cultivados en suero fetal bovino, lo cual hace que el producto sea muy costoso e inviable en países en vía de desarrollo, por lo que se desarrolló el cultivo de queratinocitos en suero del mismo paciente (autólogo), sobre fibroblastos del mismo paciente (autólogos) como capa alimentadora, y con queratinocitos del mismo paciente (autólogo), evitando así reacciones inmunológicas y de rechazo para cubrimiento de áreas cruentas mejorando la viabilidad cutánea en procesos invasivos y logrando con este medio epitelización (crecimiento de piel) completa en muy corto tiempo, con excelentes resultados y a costos muy bajos.

Dado lo anterior, en el mundo se han buscado mecanismos alternativos para cubrir las áreas afectadas. Dentro de los mismos se destaca el proceso para crear piel que permita reemplazar la piel perdida, y evitar todo el trauma antes mencionado. Hasta el momento, el proceso, se había logrado desarrollar a partir de células de cadáver, no obstante el proceso presentaba problemas pues al ser piel de cadáver la utilizada en muchos casos se creaba una reacción inmunológica que podía generar rechazo al tejido y resultados poco satisfactorios. Adicionalmente los costos de este proceso son sumamente elevados pues al ser piel tomada de cadáver se deben realizar múltiples exámenes de compatibilidad inmunológica y otros para descartar enfermedades contagiosas como VIH y Hepatitis.

Resumen de la invención

A partir de 2008, un grupo de médicos cirujanos y cirujanos plásticos emprendió la tarea de buscar una manera de crear piel evitando las complicaciones anteriormente mencionadas. De esta forma decidieron buscar la forma de crear piel a partir de una porción muy pequeña (3 mm) de piel de la persona afectada, garantizando los beneficios de utilizar tejido cultivado y evitando las desventajas de los riesgos de incompatibilidad, de altos costos y cicatrices adicionales.

Las ventajas de nuestro proceso de creación de la piel a partir de células del mismo paciente tiene implicaciones muy importantes para la ciencia y el futuro de la cirugía plástica y la medicina a nivel mundial. Dentro de los mismos es importante destacar:

1. El proceso no deja cicatriz adicional a la de la lesión cutánea ya que la piel que se toma es mínima y de lugares no visibles.
2. No crea un trauma en el paciente por lo cual no genera dolor.
3. No tiene problemas de rechazo inmunológico ya que los tejidos usados son del mismo paciente.
4. No es requisito realizar el procedimiento en cirugía.
5. El proceso puede ser manejado por enfermeras y médicos de cualquier especialidad.
6. No es necesario que el hospital donde se esta tratando al paciente adquiriera los materiales especiales de toma de piel (llamado Dermatomo), y las cuchillas para el mismo, las cuales son de alto costo ya que son de un solo uso. Estos productos no son necesarios en el proceso de cultivo de piel desarrollado por nosotros.
7. El costo de producción es un 80% más económico que el de la piel de cadáver y los resultados estéticos mucho mejores.
8. El costo de producción y distribución es 50% mas bajo que el costo de un procedimiento quirúrgico para un área de 20 x 20 cm.

Es un proceso que, con un entrenamiento básico, es replicable en cualquier lugar del mundo, incluidos países en vía de desarrollo, ya que todos los materiales utilizados son los de uso básico de cualquier laboratorio.

A continuación se presenta un breve análisis comparativo que muestra el estado de la técnica en varias modalidades frente a la presente invención. Dicho análisis tiene como objetivo destacar las ventajas de la presente invención las cuales le conceden las características necesarias para el otorgamiento de la patente solicitada.

Existe una amplia documentación que muestra el estado de la técnica en donde se detallan los procesos utilizados y en base a esos documentos que se citan a continuación, se puede hacer la comparación detallada de dichos procesos frente al proceso de la presente invención y llegar a las conclusiones expuestas arriba en este documento. Dichas referencias se dan más adelante, las cuales pueden ser consultadas.

Desde hace varios años se vienen desarrollando diferentes métodos de cultivos celular para cobertura de áreas cruentas de piel y/o sustitutos cutáneos. La novedad en nuestro

producto es que es producido de células autólogas con suero del paciente (Autólogo), logrando capas de piel en tres días. Entre los otros métodos encontramos:

1. SUSTITUTOS DE PIEL, HSE (HUMAN SKIN EQUIVALENT)

A. CULTIVO DE CELULAS DE DONANTE O CADAVER

Este método se diferencia del desarrollado por nosotros ya que se toman muestras o porciones de piel de cadáveres o donantes y mediante un proceso de criogenización y preservación que requiere de múltiples químicos y compuestos, almacenan porciones de piel congelados para luego ser aplicados a los pacientes que lo requieran. Esto necesita estudios inmunológicos tanto del donante como del paciente para disminuir el riesgo de rechazo. Las diferencias principales son:

NUESTRO PRODUCTO	CULTIVOS DE DONANTE O CADÁVER
Células del mismo paciente	Piel de donante o cadáver
Suero Autólogo	Suero fetal Bovino y glicerol y Dimetil Sulfoxido
Suero Autólogo	Factores de crecimiento; Insulina, Interleuquinas, Trombina
Cobertura definitiva	Apósito temporal
No requiere mas procedimientos	Requiere Injertos de pie adicional
Se obtiene en 3 días	Esta almacenado y listo
No requiere exámenes de laboratorio adicionales	Requiere pruebas inmunológicas, anti CMV y Anti HTLV1, Hepatitis B, VHI, Serología, Pruebas renales y Hepáticas, y cultivos bacteriológicos de la piel.
No transmite enfermedades	Puede transmitir enfermedades
No se necesitan donantes	Se necesitan donantes
No se necesitan donantes	Donantes menores de 75 años y tiempo de

	muerto menor a 6 horas
La extracción de la piel se realiza en cualquier habitación	La extracción de la piel es en habiente estéril
Requiere almacenamiento en nevera convencional a -4°C	Almacenamiento en congelador a -80°C
	Requiere criopreservación
No requiere ningún proceso especial en el momento de aplicación	Se debe descongelar y lavar en suero previo a la aplicación
Bajo Costo	Alto Costo
NO hay rechazo	Hay Rechazo Siempre

B. COMPUESTOS BASADOS EN COLAGENO SINTETICO Y ANALOGOS DERMICOS SINTETICOS

Proceso completamente diferente al nuestro ya que son apósitos temporales (no definitivos) producidos de compuestos sintéticos y/o de animales. NO toman células ni suero de seres humanos. Se almacenan y están disponibles inmediatamente a diferentes costos y nombres comerciales en el mercado. Entre estos encontramos a Biobrane, Transyte, Integra, Alloderm, Allograf., Apligraf y Dermalogen.

2. CULTIVOS CELULARES DE QUERATINOCITOS

Los cultivos celulares se han ido desarrollando desde hace 3 décadas y en la actualidad es incluso posible cultivar células dérmicas a partir de células madre, así que las células dérmicas se pueden producir muy fácilmente. Las diferencias más marcadas con los otros métodos de cultivo celular es que nosotros logramos tener un apósito del tamaño requerido en 3 días con una confluencia de queratinocitos suficiente para cubrir áreas cruentas mientras los otros métodos se toman por lo menos 3 semanas en el caso de los cultivos de queratinocitos autólogos.

Adicionalmente nuestro método no requiere donante ni estudios adicionales ya que usamos tanto células como suero del mismo paciente, cosa que ninguno de los otros métodos hace.

NUESTRO PRODUCTO	QUERATINOCITOS HETEROLOGOS	QUERATINOCITOS AUTOLOGOS
Células del mismo paciente	Células de donante	Células del mismo paciente
Suero Autólogo	Suero fetal Bovino	Suero fetal Bovino
Suero Autólogo	Factores de crecimiento, Insulina, Interleucinas, Trombina	Factores de crecimiento, Insulina, Interleucinas, Trombina
Cobertura definitiva	En ocasiones pueden requerir Injerto piel	En ocasiones pueden requerir Injerto piel
No requiere mas procedimientos	En ocasiones pueden requerir Injerto piel	En ocasiones pueden requerir Injerto piel
Se obtiene en 3 días	Se obtiene entre 3-4 semanas	Se obtiene entre 3-4 semanas
No requiere exámenes de laboratorio adicionales	Requiere pruebas inmunológicas, anti CMV y Anti HTLV1, Anticuerpos Monoclonales, Hepatitis B, VHI, Serología, Pruebas renales y Hepáticas, y cultivos bacteriológicos de la piel.	Requiere cultivos Bacteriológicos.
No transmite enfermedades	Puede transmitir Enfermedades	No transmite enfermedades
No se necesitan donantes	Se necesitan donantes	No se necesitan donantes
No hay rechazo	Puede haber Rechazo	No hay Rechazo

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kultiviert keratinozyten: gestern-heute. Bettina Bierbocks, K. Pickl-Herk, R. Soller, Gs Bayer, G. Meissl, M. Frey.
2. Estandarización de un método de cultivo de queratinocitos primarios y su co cultivo con fibroblastos en mallas de colágeno I. Posada María Mercedes, Fontanilla Marta Raquel.

3. Kolf, c.m.; cho, e.; tuan, r.s. 2007. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. In: <http://arthritis-research.com/content/9/1/204>. Consulted: october 29th, 2007
4. Myers, s.r.; leigh, i.m.; navsaria, h. 2007. Epidermal repair results from activation of follicular and epidermal progenitor keratinocytes mediated by a growth factor cascade. *Wound rep. Reg.* 15, 693-701.
5. Staiano-coico, l; higgins, p.j.; darzynkiewicz, z.; kimmel, m.; gottlieb, a.b.; pagan-charry, i.; madden, m.r.; finkestein, j.l.; hefton, j.m. 1986. Human keratinocyte culture: identification and staging of epidermal cell subpopulations. *J. Clin. Invest.* 77, february, 396-404.
6. Jiao, xiang-yang m.d.; tanczos, eszter m.d.; dodic, tom; voigt, mathias m.d.; haberstroh, joerg vet. M.d.; stark, g. Bjorn m.d. prefabrication of bilaminar-epithelialized composite flap with tissue expander and cultured keratinocytes. *Plastic & reconstructive surgery.* 103(1):138-144, january 1999.
7. Kangesu, thirloshan m.s., f.r.c.s.(plast.); manek, sanjiv m.r.c.path.; terenghi, giorgio ph.d.; gu, xu-hong b.sc.; navsaria, harshad a. M.sc. Nerve and blood vessel growth in response to grafted dermis and cultured keratinocytes. *Plastic & reconstructive surgery.* 101(4):1029-1038, april 1998.
8. Pandya, a. N. M.s., m.ch.(plast.), dip.nat.board (gen.) (plast.), f.r.c.s.(edin.), f.r.c.s.(glas.); woodward, b. Ph.d.; parkhouse, n. D.m. the use of cultured autologous keratinocytes with integra in the resurfacing of acute burns. *Plastic & reconstructive surgery.* 102(3):825-828, september 1998.
9. Magnusson, mark f.r.a.c.s.(plast.); papini, remo p. F.r.c.s.(plast.); rea, suzzane m. F.r.c.s.i.(plast.); reed, chris c. B.sc.(eng.); wood, fiona m. Cultured autologous keratinocytes in suspension accelerate epithelial maturation in an in vivo wound model as measured by surface electrical capacitance. *Plastic & reconstructive surgery.* 119(2):495-499, february 2007.

10. Simman, richard m.d.; talisman, ran m.d.; soroff, harry s. M.d.; hatch, gabriele a.b.; simon, marcia ph.d. cultured palmar keratinocytes after auto-engraftment to plantar surface maintain site and function specificity. *Plastic & reconstructive surgery*. 104(1):175-179, july 1999.
11. Butler, charles e. M.d.; orgill, dennis p. M.d., ph.d.; yannas, ioannis v. Ph.d.; compton, carolyn c. M.d., ph.d. effect of keratinocyte seeding of collagen-glycosaminoglycan membranes on the regeneration of skin in a porcine model. *Plastic & reconstructive surgery*. 101(6):1572-1579, may 1998.
12. imaizumi f, asahina i, moriyama t, ishii m, omura k. Cultured mucosal cell sheet with a double layer of keratinocytes and fibroblasts on a collagen membrane. *Tissue eng*. 2004 may-jun;10(5-6):657-64.
13. Smirnov sv, Kiselev iv, Rogovaya os, Vasil'ev av, terskikh vv. Skin repair by transplantation of cultured keratinocytes. *Bull exp biol med*. 2003 jun;135(6):608-9.
14. Voigt m, Schauer m, Schaefer dj, andree c, horch r, stark gb. Cultured epidermal keratinocytes on a microspherical transport system are feasible to reconstitute the epidermis in full-thickness wounds. *Tissue eng*. 1999 dec;5(6):563-72.
15. Bell e, Sher s, Hull b, Merrill c, Rosen s, Chamson a, asselineau d, dubertret l, coulomb b, lapiere c, nugins b, neveux y. The reconstitution of living skin. *J invest dermatol*. 1983 jul;81(1 suppl):2s-10s
16. A.w.c. chua, d.r. ma, i.c. song, t.t. phan, s.t. lee and c. Song in vitro evaluation of fibrin mat and tegaderm™ wound dressing for the delivery of keratinocytes—implications of their use to treat burns *burns, in press, corrected proof, available online 29 october 2007*
17. Bishara s. Atiyeh and michel costagliola cultured epithelial autograft (cea) in burn treatment: three decades later *burns, volume 33, issue 4, june 2007, pages*

405-413

18. D.d. lozano the effect of a fibroblast derived skin substitute on keratinocyte proliferation *burns, volume 33, issue 1, supplement 1, february 2007, pages s62-s63*
19. Matthias rab, rupert koller, margot ruzicka, gudrun burda, lars peter kamolz, bettina bieroachs, guenther meissl and manfred frey . Should dermal scald burns in children be covered with autologous skin grafts or with allogeneic cultivated keratinocytes?—"the viennese concept" *burns, volume 31, issue 5, august 2005, pages 578-586*
20. L.p. kamolz, m. Luegmair, n. Wick, b. Eisenbock, s. Burjak, r. Koller, g. Meissl and m. Frey .the viennese culture method: cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on fibroblast containing fibrin glue gels *burns, volume 31, issue 1, february 2005, pages 25-29*
21. C. -j. Gustafson and g. Kratz. Cultured autologous keratinocytes on a cell-free dermis in the treatment of full-thickness wounds. *Burns, volume 25, issue 4, june 1999, pages 331-335*
22. J. E. Paddle-ledinek, d. G. Cruickshank and j. P. Masterton. Skin replacement by cultured keratinocyte grafts: an australian experience *burns, volume 23, issue 3, may 1997, pages 204-211*

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1** muestra una fotografía de la separación de la piel después de la digestión.
- La figura 2** es una vista de la monocapa de queratinocitos a las 96 horas de crecimiento.
- La figura 3** muestra los queratinocitos sobre fibroblastos
- La figura 4** muestra como se ven los apósitos de colágeno con fibroblastos y queratinocitos.

- La figura 5** muestra el estado del cultivo de queratinocitos y fibroblastos con suero autólogo del paciente colocados sobre la malla de colágeno. Se puede observar la adecuada confluencia y adhesión celular.
- La figura 6** muestra un paciente de 56 años con quemadura de segundo grado en abdomen que fue manejado con el producto de la presente invención, mostrando epitelización completa al quinto día.
- Las figuras 7 A-D** muestra un paciente con quemadura en antebrazo manejado con el producto obtenido mediante el proceso de la presente invención. En 7C se puede notar el aspecto del apósito al tercer día adherido y como se desprende a medida que la epitelización avanza hasta despegarse por completo con el cierre completo de la herida según se muestra en 7D.
- Las figuras 8A-D** muestran la evolución de un paciente con quemadura de segundo grado profundo superficial y profundo del miembro superior con área cruenta residual en el brazo tratado con el producto obtenido mediante el proceso de la presente invención.
- Las figuras 9A-D** muestran la evolución de un paciente de 10 años con una quemadura en el dorso del pie derecho que ha sido tratado con el producto obtenido mediante el proceso de la presente invención. El seguimiento de 6 meses muestra una cicatriz plana, levemente pigmentada peri sin induración (Fig. 9D).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención está relacionada con un proceso de formación de apósitos o parches de piel para cubrir, curar, cicatrizar, aliviar pérdidas cutáneas en pacientes. Dicho proceso se describe a continuación con base en una modalidad ilustrativa cuyo único fin es el de explicar la invención para ser comprendida en su alcance y espíritu. Debe entenderse que numerosas variaciones pueden lograrse por aquellos versados en la técnica, las cuales caen dentro del alcance y espíritu de la presente invención. Dicho alcance está solo determinado por las reivindicaciones adjuntas.

El proceso en general se basa en la toma de una muestra de piel y una muestra de sangre del paciente y en base a estos dos elementos se cultiva la piel, la cual es colocada sobre

un parche de colágeno para producir un apósito que posteriormente se coloca sobre un paciente que lo requiera. Dicho proceso comprende dos subprocesos que se pueden realizar de manera simultánea o sucesiva, aunque se prefiere la manera simultánea de llevar a cabo los subprocesos. Un subproceso se inicia en la etapa 10 para el tratamiento de la piel superficial y el otro sub proceso se inicia simultáneamente o a continuación en la etapa 10'. Así, el proceso de la invención se describe por las siguientes etapas:

I - *Día 0:

A -Toma de muestra de piel y de sangre autólogos.

1. Obtener del paciente una muestra de piel, que tiene un área entre 2 mm^2 y 4 mm^2 , preferiblemente 3 mm^2 y un espesor entre 0,30 mm a 0,65mm,
2. Obtener una muestra de sangre de $20 - 50 \text{ cm}^3$ de la persona que requiere la piel (autóloga).

B -Digestión de la piel (18 horas)

3. Lavar muestra de piel obtenida con, entre 2 cm^3 y 10 cm^3 de solución amortiguadora de fosfato (PBS).
4. Colocar la muestra de piel autóloga en una solución de Tripsina al 0.25% por 18 horas a 4° C .

C -Obtención de suero autólogo a partir de la sangre del paciente

5. Centrifugar la muestra de sangre autóloga durante 10 minutos a 1200 rpm obteniendo entre 10 cm^3 a 25 cm^3 de plasma.
6. Almacenar dicho plasma a 4° C .
7. Inactivar la Tripsina aplicada mediante la adición de 2 cm^3 a 5 cm^3 de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa), 2 cm^3 a 5 cm^3 de solución amortiguadora de fosfato (PBS) y $0,5 \text{ cm}^3$ a 2 cm^3 de 10,000 U.I. de Penicilina, 10 mg de Estreptomicina Sulfato y 25/-1.g de Anfotericina B.

II - *Día 1:

D -Separación de las dos capas de la piel autóloga. (Ver figura 1)

8. Separar luego la piel autóloga en dos capas (explantes) mediante la ayuda de pinzas: una capa superficial de epidermis y una profunda de dermis que contiene fibras de colágeno.

9. Lavar los explantes (las 2 capas de piel) por separado repetidamente (entre 3 y 10 veces) con solución amortiguadora de fosfato (PBS). ***;

E -Cultivo y replicación de queratinocitos en suero autólogo (72 hrs) obtenidos a partir de la capa superficial de la piel autóloga obtenida después de la digestión.

10. Recoger la porción superficial de la piel en un tubo estéril;

11. centrifugar dicho tubo por 10 minutos a 1200 rpm.

12. Descartar el sobrenadante;

13. Resuspender el botón de células resultante en 5 cm³ a 10 cm³ de medio DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa).

14. Sembrar las células contenidas en este líquidos a una densidad de 75.000 a 90.000 células/cm² en cajas estériles;

15. Verificar la densidad celular mediante conteo celular en cámara de Neubauer;

16. Almacenar las células (queratinocitos) sembradas a 37°C durante 24 horas.

F -Cultivo y replicación de Fibroblastos autólogos obtenidos a partir de la capa profunda que resulta después de la digestión.

10' a continuación de la etapa 9, sembrar la porción profunda de la piel autóloga obtenida después de la digestión en una caja estéril;

11' Adicionar de 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glusosa) y de 2 cm³ a 5 cm³ de plasma obtenido de la sangre de la persona que requiere la piel;

12' Almacenar lo resultante a 37° C durante 48 horas para permitir el crecimiento de fibroblastos.

- 13' A las 48 horas de sembrados y almacenados los fibroblastos se extraen y se colocan en un tubo estéril;
- 14' Centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm dicho tubo;
- 15' Descartar el sobrenadante;
- 16' Adicionar al botón celular 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa) y de 2 cm³ a 5 cm³ de plasma autólogo obtenido de la sangre de la persona que requiere la piel.

III - *Día 2:

G -Cambio de medio de cultivo de los queratinocitos autólogos.

17. Extraer el líquido o medio de cultivo a las 24 horas de almacenado el cultivo de queratinocitos;
18. Aplicar nuevamente de 2 cm³ a 5 cm³ de medio DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa) mas 1 cm³ a 10 cm³ de plasma Autólogo (resultante de la sangre del paciente);
19. Almacenar nuevamente por 24 horas a 37° C. (Ver Figura 2)

IV - *Día 3:

H - Siembra de los Fibroblastos cultivados sobre una malla de colágeno.

20. sembrar el producto obtenido en la etapa 16' sobre una malla de colágeno del tamaño requerido;
21. Verificar que los fibroblastos autólogos queden a 90% de confluencia;
22. Colocar esta malla sobre una tabla oscilante durante un mínimo de 4 horas;
23. Almacenar nuevamente a 37°C durante mínimo 20 horas;

I - Siembra de los queratinocitos cultivados sobre los fibroblastos y la malla de colágeno (24hrs) (Ver figura 3)

24. Después de 24 horas de haber cambiado el medio y almacenado los queratinocitos se procede a despegarlos de la caja empleando de 2 cm³ a 10 cm³ de solución amortiguadora de fosfato (PBS);
25. Colocar este líquido con las células en un tubo estéril y centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm.
26. Descartar el sobrenadante resultante de la centrifugación;
27. resuspender el botón celular en 5 cm³ a 10 cm³ del plasma autólogo.
28. Sembrar los queratinocitos sumergidos en el plasma sobre los fibroblastos y la malla de colágeno verificando que se encuentren a una densidad de 250.000 células/cm²;
28. almacenar las células sembradas a 37° C durante otras 24 horas;
29. Observar después de este tiempo la confluencia y adhesión celular sobre los apósitos de colágeno para obtener una adecuada capa de piel de tejido autólogo. (Ver figuras 4 y 5)

V - *Día 4:

- J - Entrega del apósito de piel para ser colocada sobre la persona que lo requiere.

Resumen del proceso de acuerdo con la invención

I - *Día 0:

- A -Toma de muestra de piel y de sangre autólogos.
- B -Digestión de la piel (18 h)
- C -Obtención de suero autólogo a partir de la sangre del paciente

II - *Día 1:

- D -Separación de las dos capas de la piel autóloga.
- E -Cultivo y replicación de queratinocitos en suero autólogo (72 h) obtenidos a partir de la capa superficial de la piel autóloga obtenida después de la digestión.
- F -Cultivo y replicación de Fibroblastos autólogos obtenidos a partir de la capa profunda que resulta después de la digestión.

III - *Día 2:

G -Cambio de medio de cultivo de los queratinocitos autólogos.

IV - *Día 3:

H -Siembra de los Fibroblastos cultivados sobre una malla de colágeno.

I -Siembra de los queratinocitos cultivados sobre los fibroblastos y la malla de colágeno (24h)

V - *Día 4:

J – Obtención del producto final como un parche o apósito de capa de piel para ser colocada sobre la persona que lo requiere.

El resultado de la aplicación del proceso descrito de la presente solicitud de patente es un parche o apósito conformado con piel creada sobre un sustrato de colágeno. Dicho producto se aplica directamente sobre el área de pérdida cutánea, lo que permite la generación de piel sobre la herida del paciente de una forma limpia y rápida obteniéndose resultados como los que se describen en los ejemplos que siguen y en las figuras 6 a 9.

EJEMPLOS DE APLICACIÓN Y DESARROLLO DE LA INVENCIÓN EN CASOS REALES

Se manejaron 10 pacientes con áreas cruentas cutáneas de la siguiente manera. Se realizó un lavado inicial más desbridamiento del área cruenta, momento en el cual se tomó una muestra de piel sana de 3 mm de longitud y se extrajeron 20 cm³ de sangre. Esto se llevó al laboratorio y se realizó el proceso anteriormente descrito.

A los tres días de la toma de la muestra ya se cuenta con un apósito con fibroblastos y queratinocitos con una densidad celular adecuada listo para ser colocado (Fig 5). Se realiza un nuevo lavado del área cruenta y se pone el apósito cubriéndose este con gasas y un apósito transparente. Se realiza destape al quinto día de colocado el explante encontrando epitelización completa en todos los pacientes tratados (Fig 8 y 9).

Se realizó seguimiento fotográfico de los pacientes encontrando que el área tratada con los queratinocitos autólogos presentaba una cicatriz de mejor calidad, sin induración y

sin retracciones, mientras que las áreas que cicatrizaron por segunda intención y con curaciones presentaba hipertrofia de la cicatriz (Fig 6 y 7).

CONCLUSIONES DE LOS EJEMPLOS Y RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE LA INVENCION

Los pacientes con áreas cruentas cutáneas han sido manejados a través de la historia mediante diferentes métodos y en la actualidad existen diferentes opciones de tratamiento que van desde el cierre por segunda intención hasta los cultivos celulares heterólogos. En el mundo se han desarrollado los cultivos de queratinocitos heterólogos y está estandarizado el método para el cultivo de los mismos, pero estos requieren estudios inmunológicos al tratarse de células extrañas al huésped receptor.

Ante esta dificultad desarrollamos y estandarizamos un método que permite de una muestra muy pequeña de piel obtener apósitos con queratinocitos y suero autólogo en tres días, con lo que se logra epitelización completa al 5to día, siendo esta cicatriz diferente a la que presentan estos pacientes con injertos de piel o con cierre por segunda intención ya que no presenta contracción o retracción y ofrece una alternativa viable para el manejo de áreas cruentas sin cicatrices adicionales de las áreas donantes de injertos.

La presente invención ha sido descrita mediante una modalidad ilustrativa de la misma. Debe entenderse que dicha descripción debe leerse como no limitativa de la invención, ya que cualquier persona versada en la técnica puede introducir cambios y modificaciones que no se salen del alcance y espíritu de la invención, el cual solo está definido por el tenor de las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

Un proceso para generar un parche o apósito con piel caracterizado por que comprende las etapas de:

I - *Día 0:

- A -Toma de muestra de piel y de sangre autólogos.
- B -Digestión de la piel durante 18 h
- C -Obtención de suero autólogo a partir de la sangre del paciente

II - *Día 1:

- D -Separación de las dos capas de la piel autóloga.
- E -Cultivo y replicación de queratinocitos en suero autólogo durante 72 h obtenidos a partir de la capa superficial de la piel autóloga obtenida después de la digestión.
- F -Cultivo y replicación de Fibroblastos autólogos obtenidos a partir de la capa profunda que resulta después de la digestión.

III - *Día 2:

- G -Cambio de medio de cultivo de los queratinocitos autólogos.

IV - *Día 3:

- H -Siembra de los Fibroblastos cultivados sobre una malla de colágeno.
- I -Siembra de los queratinocitos cultivados sobre los fibroblastos y la malla de colágeno durante 24h

V - *Día 4:

- J – Obtención del producto final como un parche o apósito de capa de piel para ser colocada sobre la persona que lo requiere.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa I – A comprende las etapas:

1. Obtener del paciente una muestra de piel, que tiene un área entre 2 mm² y 4 mm², preferiblemente 3 mm² y un espesor entre 0,30 mm a 0,65mm,

2. Obtener una muestra de sangre de 20 -50 cm³ de la persona que requiere la piel (autologa).
3. El proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la etapa I – B comprende las etapas:
 3. Lavar muestra de piel obtenida con, entre 2 cm³ y 10 cm³ de solución amortiguadora de fosfato (PBS).
 4. Colocar la muestra de piel autóloga en una solución de Tripsina al 0.25% por 18 horas a 4° C.
4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – C comprende las etapas:
 5. Centrifugar la muestra de sangre autóloga durante 10 minutos a 1200 rpm obteniendo entre 10 cm³ a 25 cm³ de plasma.
 6. Almacenar dicho plasma a 4° C.
 7. Inactivar la Tripsina aplicada mediante la adición de 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa), 2 cm³ a 5 cm³ de solución amortiguadora de fosfato (PBS) y 0,5 cm³ a 2 cm³ de 10,000 U.I. de Penicilina, 10 mg de Estreptomicina Sulfato y 25/-1.g de Anfoterisina B.
5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – D comprende las etapas:
 8. Separar luego la piel autóloga en dos capas (explantes) mediante la ayuda de pinzas: una capa superficial de epidermis y una profunda de dermis que contiene fibras de colágeno.
 9. Lavar los explantes (las 2 capas de piel) por separado repetidamente (entre 3 y 10 veces) con ***;
6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – E comprende las etapas:

10. Recoger la porción superficial de la piel en un tubo estéril;
 11. centrifugar dicho tubo por 10 minutos a 1200 rpm.
 12. Descartar el sobrenadante;
 13. Resuspender el botón de células resultante en de 5 cm³ a 10 cm³ de medio DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa).
 14. Sembrar las células contenidas en este líquidos a una densidad de 75.000 a 90.000 células/cm² en cajas estériles;
 15. Verificar la densidad celular mediante conteo celular en cámara de Neubauer;
 16. Almacenar las células (queratinocitos) sembradas a 37°C durante 24 horas.
7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – F comprende las etapas:

- 10' a continuación de la etapa 9, sembrar la porción profunda de la piel autóloga obtenida después de la digestión en una caja estéril;
- 11' Adicionar de 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glusosa) y de 2 cm³ a 5 cm³ de plasma obtenido de la sangre de la persona que requiere la piel;
- 12' Almacenar lo resultante a 37° C durante 48 horas para permitir el crecimiento de fibroblastos.
- 13' A las 48 horas de sembrados y almacenados los fibroblastos se extraen y se colocan en un tubo estéril;
- 14' Centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm dicho tubo;
- 15' Descartar el sobrenadante;
- 16' Adicionar al botón celular 2 cm³ a 5 cm³ de DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glusosa) y de 2 cm³ a 5 cm³ de plasma autólogo obtenido de la sangre de la persona que requiere la piel.

8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – G comprende las etapas:

17. Extraer el líquido o medio de cultivo a las 24 horas de almacenado el cultivo de queratinocitos;
 18. Aplicar nuevamente de 2 cm³ a 5 cm³ de medio DMEM-HG (Medio Eagle Modificado de Dulbecco's – Alta Glucosa) mas 1 cm³ a 10 cm³ de plasma Autólogo (resultante de la sangre del paciente);
 19. Almacenar nuevamente por 24 horas a 37° C. (Ver Figura 2)
9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – H comprende las etapas:
20. sembrar el producto obtenido en la etapa 16' sobre una malla de colágeno del tamaño requerido;
 21. Verificar que los fibroblastos autólogos queden a 90% de confluencia;
 22. Colocar esta malla sobre una tabla oscilante durante un mínimo de 4 horas;
 23. Almacenar nuevamente a 37°C durante mínimo 20 horas;
10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque la etapa I – I comprende las etapas:
24. Después de 24 horas de haber cambiado el medio y almacenado los queratinocitos se procede a despegarlos de la caja empleando de 2 cm³ a 10 cm³ de solución amortiguadora de fosfato (PBS);
 25. Colocar este líquido con las células en un tubo estéril y centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm.
 26. Descartar el sobrenadante resultante de la centrifugación;
 27. resuspender el botón celular en 5 cm³ a 10 cm³ del plasma autólogo.
 28. Sembrar los queratinocitos sumergidos en el plasma sobre los fibroblastos y la malla de colágeno verificando que se encuentren a una densidad de 250.000 células/cm²;
 28. almacenar las células sembradas a 37° C durante otras 24 horas;
 29. Observar después de este tiempo la confluencia y adhesión celular sobre los apósitos de colágeno para obtener una adecuada capa de piel de tejido autólogo. (Ver figuras 4 y 5)

11. Un parche o apósito caracterizado porque comprende un sustrato de malla sobre la cual se ha colocado colágeno, encima queratinocitos y encima fibroblastos.

12. El parche o apósito de acuerdo con la reivindicación 11 caracterizado porque dichos queratinocitos y fibroblastos fueron producidos por el método de las reivindicaciones 1 a 10.

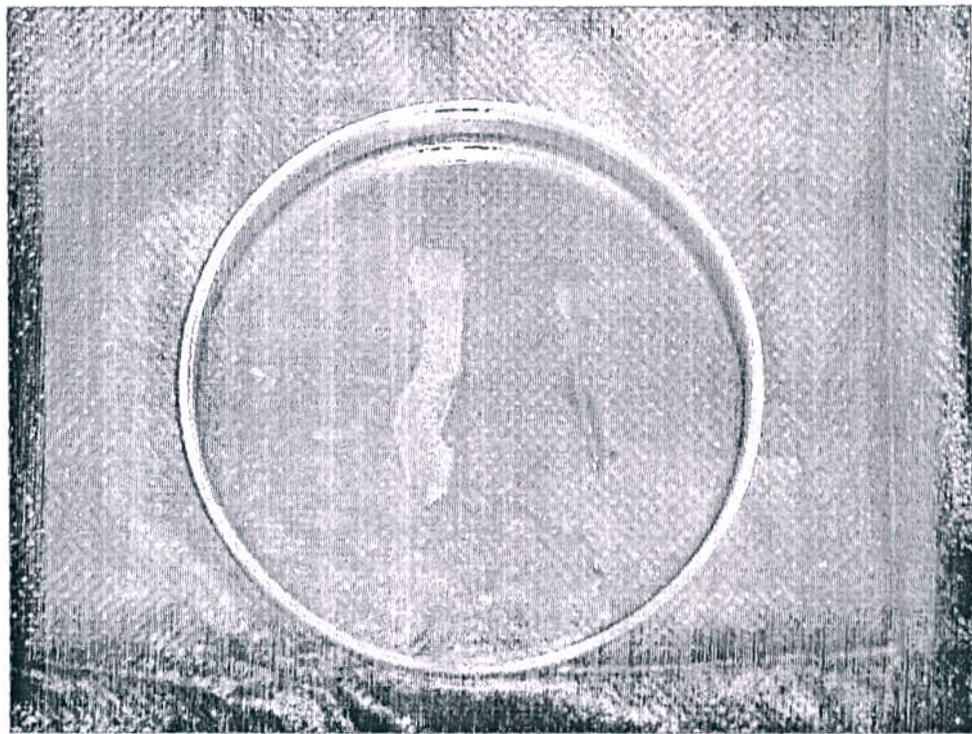


Fig 1. Separación de la piel después de la digestión

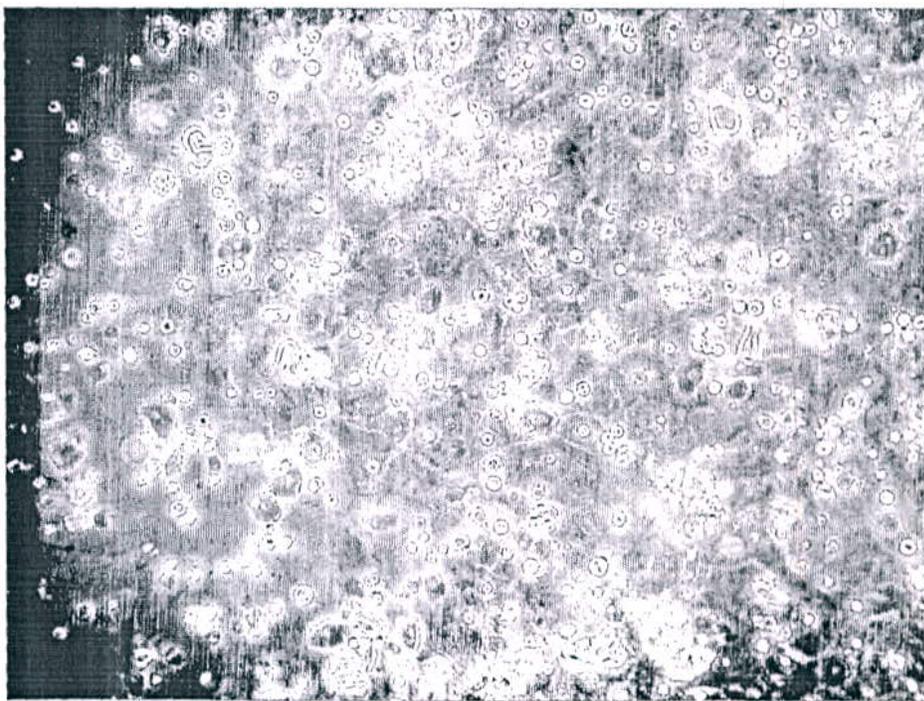


Figura 2. Monocapa de Queratinocitos a 96 horas de crecimiento

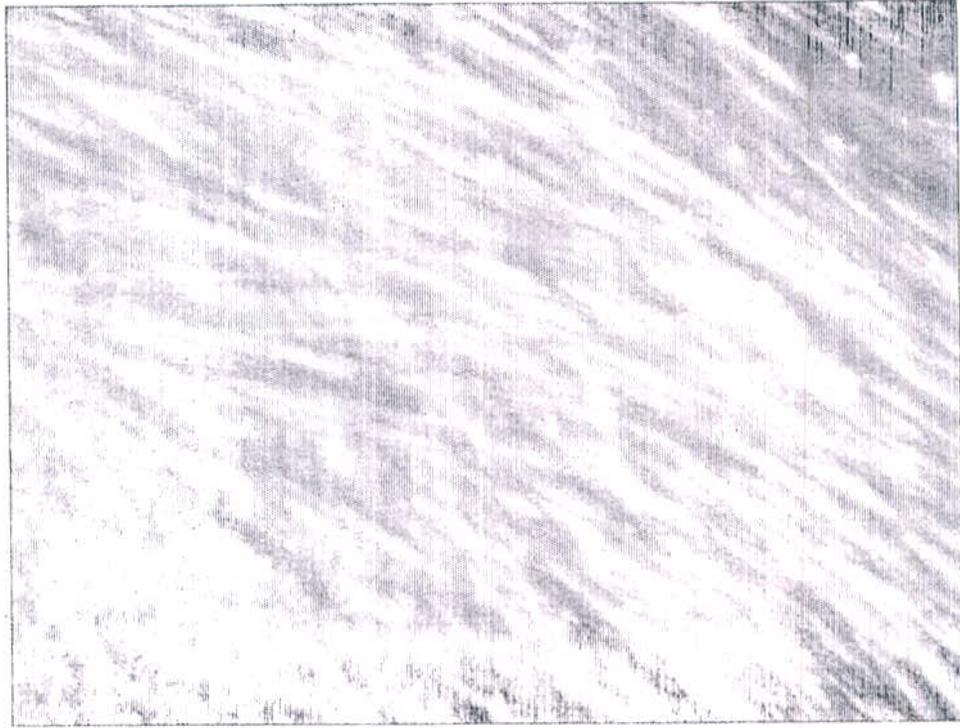


Figura 3. Queratinocitos sobre fibroblastos

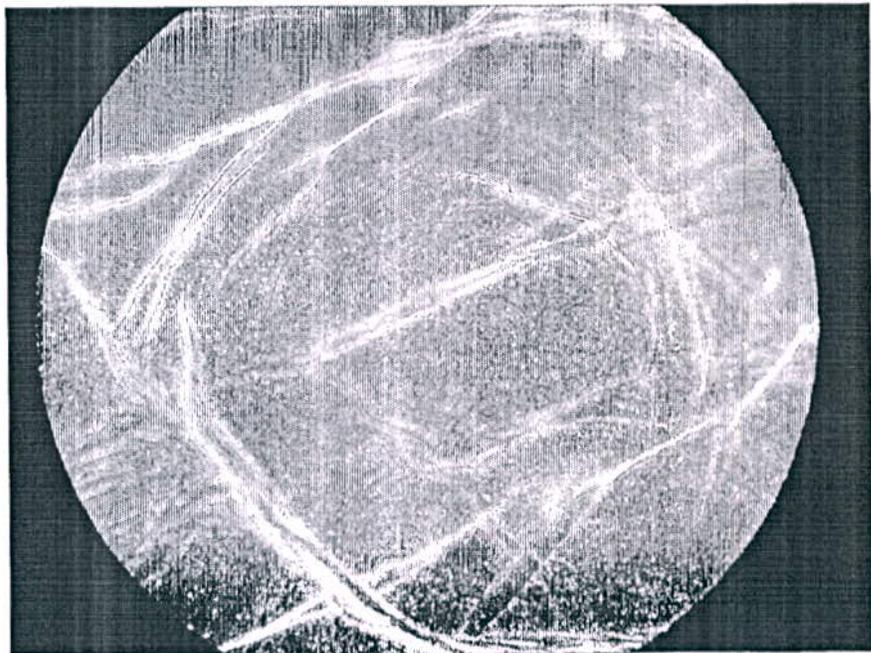


Fig 4. Apósitos de colágeno con fibroblastos y queratinocitos

3/7

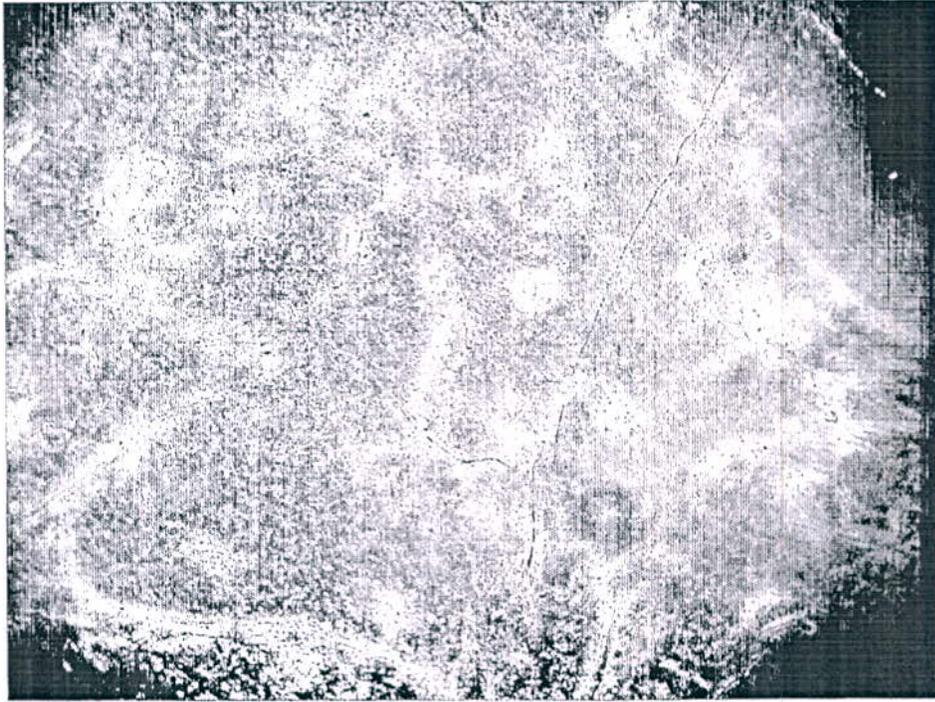


Fig 5. Estado del cultivo de queratinocitos y fibroblastos con suero autólogo del paciente sobre la malla de colágeno. Observamos la adecuada confluencia y adhesión celular.

4/7

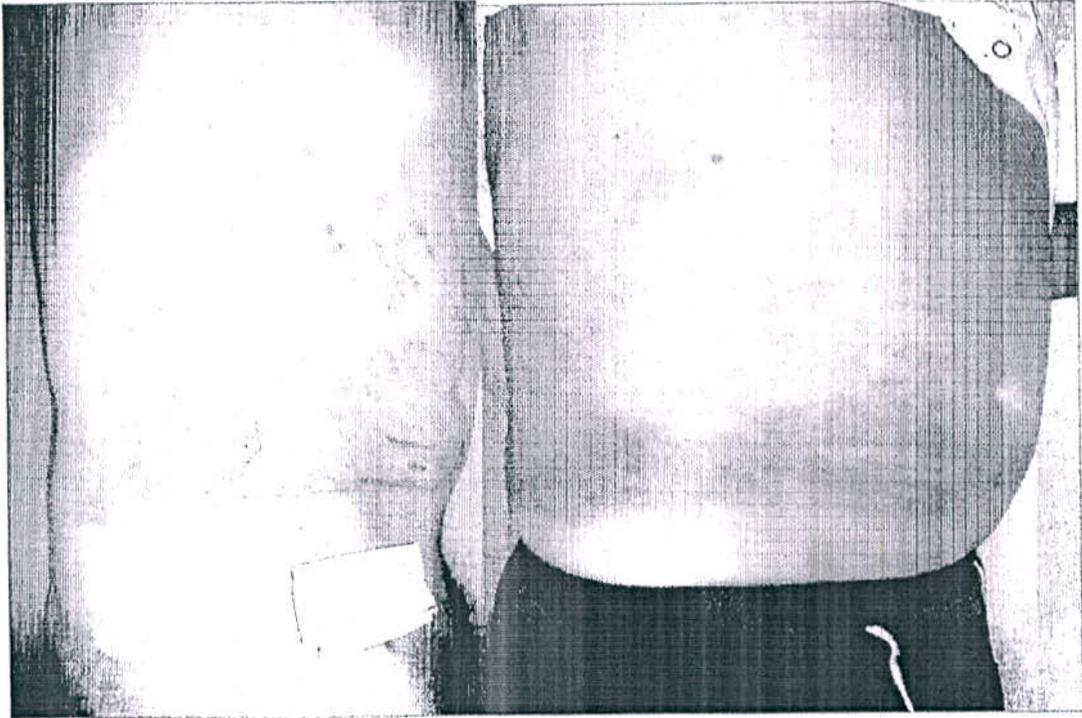


Fig 6. Paciente de 56 años con quemadura de segundo grado en abdomen que fue manejado con cultivo de queratinocitos autólogos, mostrando epitelización completa al 5to día.

5/7

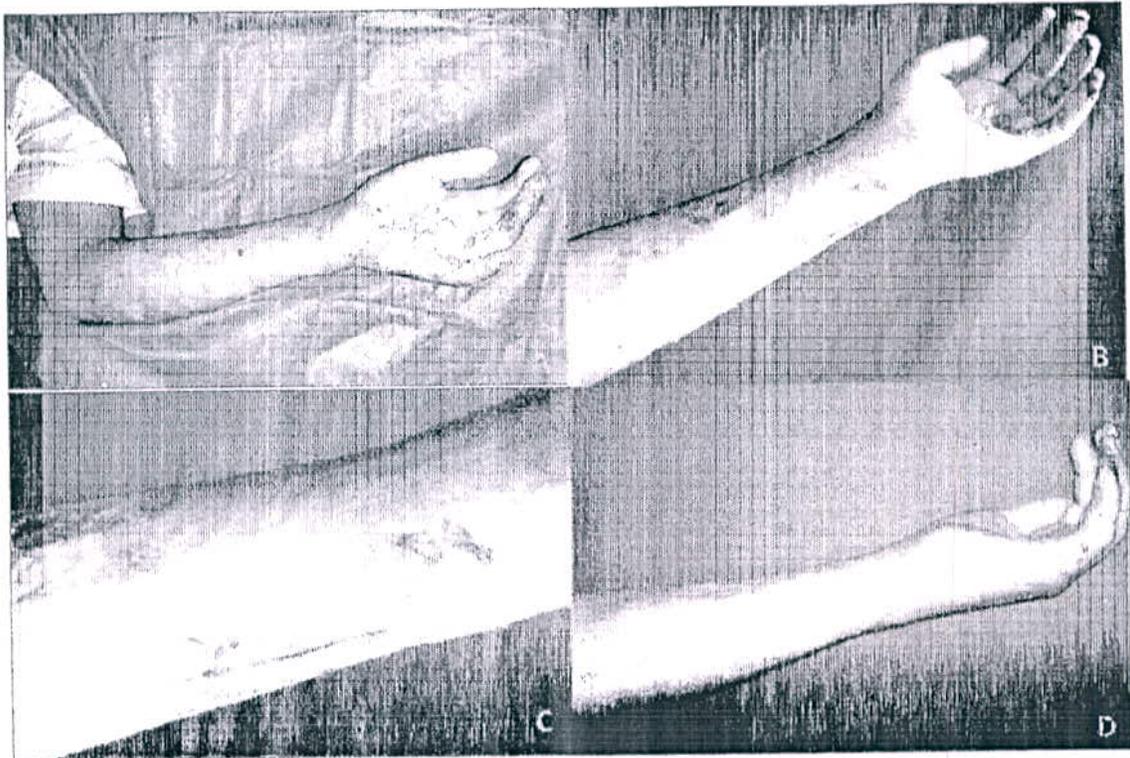


Fig 7.

Paciente con quemadura en antebrazo manejado con los queratinocitos cultivados. Nótese (C) el aspecto del apósito al 3er día adherido y como se desprende a medida que la epitelización avanza hasta desprenderse por completo con cierre completo de la herida (D).

6/7

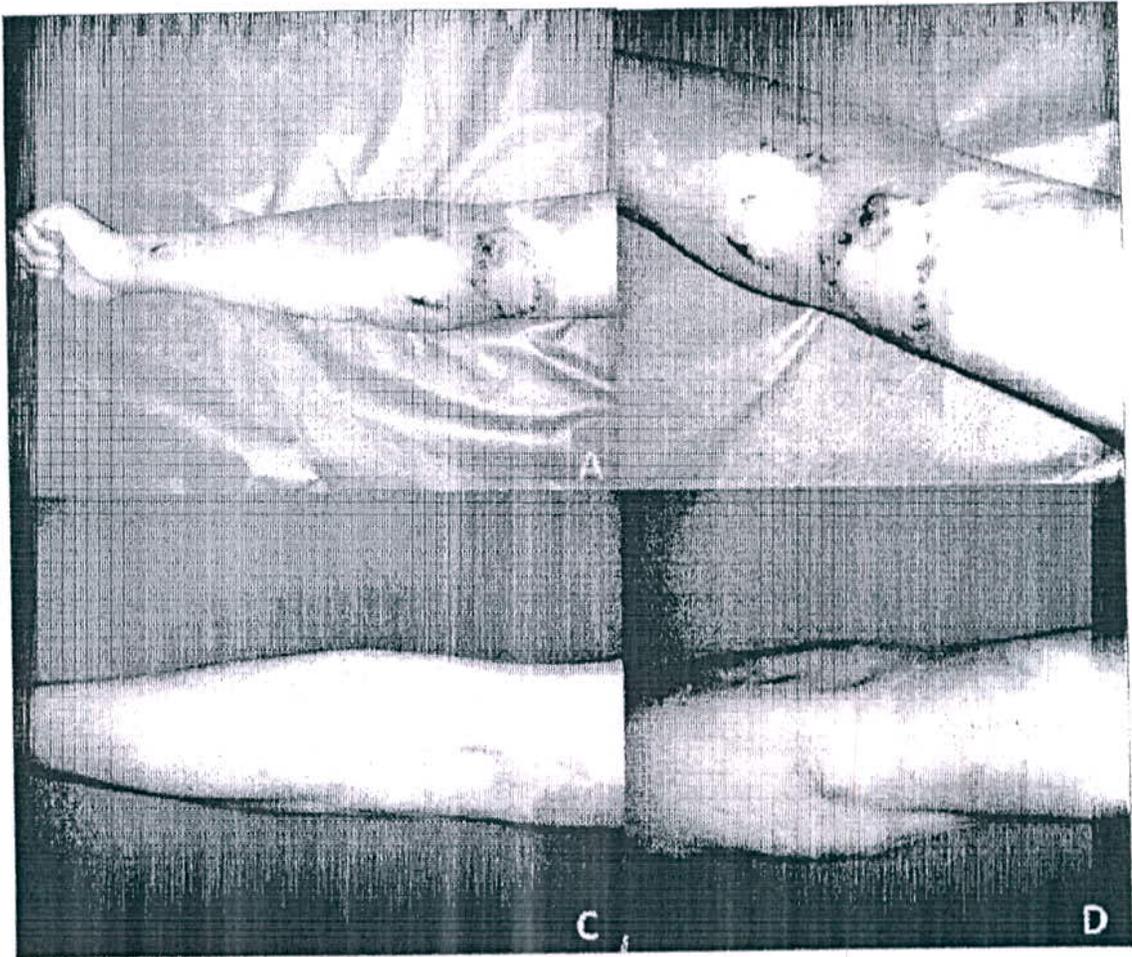


Fig 8. (A) Paciente con quemadura de segundo grado profundo superficial y profundo del miembro superior derecho con área cruenta residual en el brazo (B) Área cruenta residual cubierta con los apósitos (C) Epitelización completa al 5to día. Nótese que la zona que cicatriza por segunda intención presenta una cicatriz hipertrófica (D) Área manejada con los apósitos, la cual presenta una cicatriz plana no indurada a los 7 meses después del tratamiento.

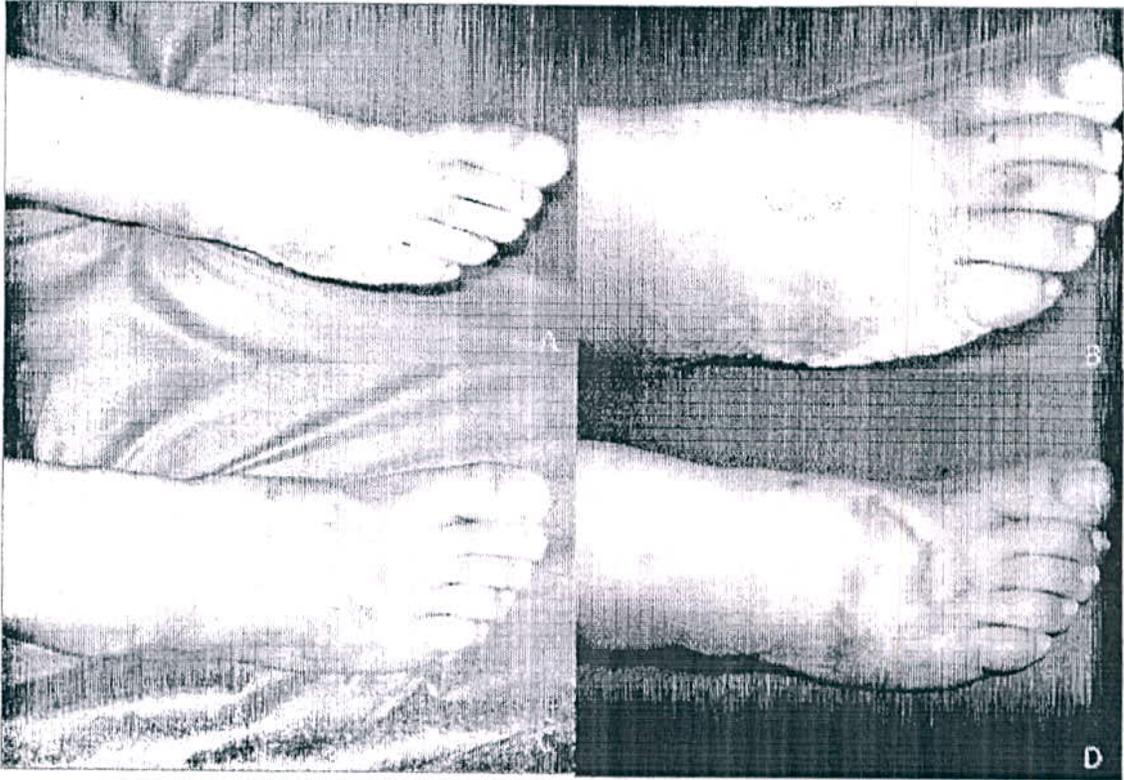


Fig 9. (A) Paciente de 10 años con una quemadura en el dorso del pie derecho. (B) Se cubre con un apósito con queratinocitos autólogos (C) Destape al 5to día mostrando epitelización adecuada. (D) Seguimiento 6 meses mostrando una cicatriz plana, levemente pigmentada pero sin induración.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ IB 2010/001215

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N 5/071 (2010.01)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hinterhuber G. et al. Organotypic keratinocyte coculture using normal human serum: an immunomorphological study at light and electron microscopic levels. <i>Experimental Dermatology</i> . 2002, Vol. 11, pages 413-420, ISSN 0906-6705 (the whole document).	1-10, 12
A	Ehrlich H. P. et al. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds. <i>The American Journal of Surgery</i> . 2004, Vol. 187, Suppl to May 2004, pages 29S-33S, doi:10.1016/S0002-9610(03)00301-5 (the whole document).	1-10, 12
A	Hansbrough J. F. et al. Burn wound closure with cultures autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate. <i>JAMA</i> . 20.10.1989, Vol. 262, Nº 15, pages 2125-2130 (the whole document).	1-10, 12

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 06.September.2010 (06.09.2010)	Date of mailing of the international search report (09/09/2010)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ O.E.P.M. Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España. Facsimile No. 34 91 3495304	Authorized officer M. Cumbreño Galindo Telephone No. +34 91 349 68 80
---	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB 2010/001215

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Wisser D. et al. Skin replacement with a collagen based dermal substitute, autologous keratinocytes and fibroblasts in burn trauma. Burns. 2003, Vol. 29, pages 375-380, ISSN 0305-4179/03 (the whole document).	1-10, 12
A	Negri S. et al. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research. 19.11.2009, Vol. 13, N° 47, pages 9211-9216, ISSN 1673-8225 (the whole document).	1-10, 12
A	Concha M. et al. Producción de equivalentes dermo-epidérmicos autólogos para el tratamiento de grandes quemados y cicatrices queloides. Cuad. Cir. 2002, Vol. 16, pages 41-47 (the whole document).	1-10, 12
A	Normand J. et al. A method for the isolation and serial propagation of keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts from a single punch biopsy of human skin. In Vitro Cell Dev. Biol.-Animal. 06.1995, Vol. 31, pages 447-455 (todo document).	1-10, 12
A	Balasubramani M. et al. Skin substitutes: a review. Burns. 2001, Vol. 27, pages 534-544, ISSN 0305-4179/01 (the whole document).	1-10, 12
A	WO 01/05942 A2 (EPITECH S. A.) 25.01.2001, (the whole document).	1-10, 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/IB 2010/001215

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0105942 A	25.01.2001	WO 0061617 A CA 2369884 AC AU 4342900 A CA 2379949 A AU 784221 B AU 6009800 A EP 1175436 AB EP 1198557 AB JP 2002541786 T JP 2003505122 T JP 3738273 B US 6548058 B US 6730513 B US 7014849 B AT 325186 T AU 2006202156 A AU 2006202156 B EP 1702979 A PT 1198557 E AT 342275 T US 2006292126 A DE 60027724 T ES 2265953 T DE 60031260 T US 2009257986 A	19.10.2000 19.10.2000 14.11.2000 25.01.2001 23.02.2006 05.02.2001 30.01.2002 24.04.2002 10.12.2002 12.02.2003 25.01.2006 15.04.2003 04.05.2004 21.03.2006 15.06.2006 15.06.2006 27.08.2009 20.09.2006 29.09.2006 15.11.2006 28.12.2006 01.03.2007 01.03.2007 03.05.2007 15.10.2009

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB 2010/001215

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 5/071 (2010.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, XPESP, BIOSIS, MEDLINE, NPL, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	Hinterhuber G. et al. Organotypic keratinocyte coculture using normal human serum: an immunomorphological study at light and electron microscopic levels. <i>Experimental Dermatology</i> . 2002, Vol. 11, páginas 413-420, ISSN 0906-6705 (todo el documento).	1-10, 12
A	Ehrlich H. P. et al. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds. <i>The American Journal of Surgery</i> . 2004, Vol. 187, Suppl to May 2004, páginas 29S-33S, doi:10.1016/S0002-9610(03)00301-5 (todo el documento).	1-10, 12
A	Hansbrough J. F. et al. Burn wound closure with cultures autologous keratinocytes and fibroblasts attached to a collagen-glycosaminoglycan substrate. <i>JAMA</i> . 20.10.1989, Vol. 262, N° 15, páginas 2125-2130 (todo el documento).	1-10, 12

 En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

06.Septiembre.2010 (06.09.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

09 septiembre de 2010 (09/09/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

M. Cumbreño Galindo

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono +34 91 349 68 80

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio 2009)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ IB 2010/001215

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

- 1. Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

- 2. Las reivindicaciones N°s: 11
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
La reivindicación 11 no define claramente el objeto cuya protección se pretende. Las características que define no están indicadas claramente y no es posible por lo tanto examinar esta reivindicación con respecto a su novedad y actividad inventiva. Además, tiene por objeto una malla de colágeno sobre la que se colocan los queratinocitos y sobre ellos los fibroblastos mientras que en la presente invención son los fibroblastos los que se colocan sobre la malla de colágeno.

- 3. Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

- 1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

- 2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

- 3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:

- 4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

- Indicación en cuanto a la protesta**
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
 - Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
 - El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB 2010/001215

60
68

C (continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	Wisser D. et al. Skin replacement with a collagen based dermal substitute, autologous keratinocytes and fibroblasts in burn trauma. Burns. 2003, Vol. 29, páginas 375-380, ISSN 0305-4179/03 (todo el documento).	1-10, 12
A	Negri S. et al. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research. 19.11.2009, Vol. 13, N° 47, páginas 9211-9216, ISSN 1673-8225 (todo el documento).	1-10, 12
A	Concha M. et al. Producción de equivalentes dermo-epidérmicos autólogos para el tratamiento de grandes quemados y cicatrices queloides. Cuad. Cir. 2002, Vol. 16, páginas 41-47 (todo el documento).	1-10, 12
A	Normand J. et al. A method for the isolation and serial propagation of keratinocytes, endothelial cells, and fibroblasts from a single punch biopsy of human skin. In Vitro Cell Dev. Biol.-Animal. 06.1995, Vol. 31, páginas 447-455 (todo el documento).	1-10, 12
A	Balasubramani M. et al. Skin substitutes: a review. Burns. 2001, Vol. 27, páginas 534-544. ISSN 0305-4179/01 (todo el documento).	1-10, 12
A	WO 01/05942 A2 (EPITECH S. A.) 25.01.2001, (todo el documento).	1-10, 12

67
60

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/IB 2010/001215

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 0105942 A	25.01.2001	WO 0061617 A	19.10.2000
		CA 2369884 AC	19.10.2000
		AU 4342900 A	14.11.2000
		CA 2379949 A	25.01.2001
		AU 784221 B	23.02.2006
		AU 6009800 A	05.02.2001
		EP 1175436 AB	30.01.2002
		EP 1198557 AB	24.04.2002
		JP 2002541786 T	10.12.2002
		JP 2003505122 T	12.02.2003
		JP 3738273 B	25.01.2006
		US 6548058 B	15.04.2003
		US 6730513 B	04.05.2004
		US 7014849 B	21.03.2006
		AT 325186 T	15.06.2006
		AU 2006202156 A	15.06.2006
		AU 2006202156 B	27.08.2009
		EP 1702979 A	20.09.2006
		PT 1198557 E	29.09.2006
		AT 342275 T	15.11.2006
		US 2006292126 A	28.12.2006
		DE 60027724 T	01.03.2007
		ES 2265953 T	01.03.2007
DE 60031260 T	03.05.2007		
US 2009257986 A	15.10.2009		

68
68

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 12 - 139922
Bogotá D.C., Diciembre 18 de 2012 - 14:43:52		

RECIBIDO DE : WOLF MENDEZ ABOGADOS ASOCIADOS LTDA NI 830.029.907

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	123885	29/11/2012		90.000.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	44196815	18/12/2012	500.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00
			=====	\$590.000.00

SON: **QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-229259- -00000-0000

Fecha: 2012-12-18 15:25:20	Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII	Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION	Folios. 68

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240



No. 12-229259-00000-0000

Fecha: 2012-12-18 15:25:20 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 68

PATENTE DE INVENCION

MODELO DE UTILIDAD

Art 33 Decisión 486/00

<input type="checkbox"/>	Indicación que se solicita una patente.
<input type="checkbox"/>	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
<input type="checkbox"/>	Descripción de la invención
<input type="checkbox"/>	Dibujos de ser estos pertinentes
<input type="checkbox"/>	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa <input type="checkbox"/>	Incompleta <input type="checkbox"/>

PATENTE DE INVENCION PCT

MODELO DE UTILIDAD PCT

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

<input checked="" type="checkbox"/>	Indicación que se solicita una PCT
<input checked="" type="checkbox"/>	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
<input checked="" type="checkbox"/>	Dibujos de ser estos pertinentes
<input checked="" type="checkbox"/>	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa <input checked="" type="checkbox"/>	Incompleta <input type="checkbox"/>

DISEÑO INDUSTRIAL

(Art. 119 Decisión 486/00)

<input type="checkbox"/>	Indicación que se solicita Diseño industrial
<input type="checkbox"/>	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
<input type="checkbox"/>	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
<input type="checkbox"/>	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa <input type="checkbox"/>	Incompleta <input type="checkbox"/>

ESQUEMA DE TRAZADO

(Art. 92 Decisión 486/00)

<input type="checkbox"/>	Indicación que se solicita un esquema de trazado
<input type="checkbox"/>	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
<input type="checkbox"/>	Representación gráfica de un esquema de trazado
<input type="checkbox"/>	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa <input type="checkbox"/>	Incompleta <input type="checkbox"/>