

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
13 de agosto de 2015 (13.08.2015) **WIPO | PCT**

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/119491 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 5/071 (2010.01) A61F 2/10 (2006.01)
A61L 27/60 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/MX2015/000001

(22) Fecha de presentación internacional:
15 de enero de 2015 (15.01.2015)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
MX/a/2014/001356
4 de febrero de 2014 (04.02.2014) MX

(72) Inventor; e

(71) Solicitante : ALVARO GALUE, Eduardo [MX/MX];
Carlos Pereira No. 1252, Monterrey, 64630 (MX).

(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, BN,
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, IR, IS, JP, KE,
KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS,
RU, RW, SA, 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, RW,
SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING A SPRAY-ON CELLULAR COMPOUND OF HUMAN FIBROBLASTS AND KERATINOCYTES IN SOLUTION AND THE USE THEREOF AS A REGENERATIVE AGENT IN SKIN LESIONS

(54) Título : PROCESO DE OBTENCION DE UN COMPUESTO DE ASPERSION CELULAR DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS HUMANOS EN SOLUCION Y SU USO COMO AGENTE REGENERATIVO DE LESIONES CUTÁNEAS

(57) Abstract: The invention relates to a process for obtaining a spray-on cellular compound of human fibroblasts and keratinocytes and to the use thereof as a regenerative agent in skin lesions, mostly diabetic ulcers and 1st, 2nd and 3rd degree burns, and as a substitute for flap surgery. The method for obtaining a spray-on cellular compound of human fibroblasts and keratinocytes comprises the steps of: isolating the dermis and epidermis, incubating the epidermal layer, disintegrating the dermal layer and proliferating the fibroblasts, disintegrating the epidermal layer, proliferating the keratinocytes in suspension, preparing the solution of crosslinking agent solution for reacting with the spray-on cellular solution and preparing the spray-on cellular solution. Said spray-on cellular compound of human fibroblasts and keratinocytes increases the effectiveness and ease of application, and is intended to be an economical, rapid and easy-to-use alternative.

(57) Resumen: El objetivo radica en un proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos y su uso como agente regenerativo de lesiones cutáneas, preferentemente de úlceras diabéticas, quemaduras de 1er, 2do y 3er grado, y un sustituto de la técnica de la utilización de colgajos. El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos se comprende de las etapas de separación de la dermis y la epidermis, incubación de la capa epidermis, disgregación de la capa de dermis y proliferación de fibroblastos, disgregación de la capa de epidermis, proliferación de los queratinocitos en suspensión, preparación de la solución del agente reticulante de reacción de la solución de aspersión celular, y preparación de la solución de aspersión celular. Dicho compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos aumenta la eficiencia de aplicación y la facilidad de la misma, con el fin de ser una alternativa económica, rápida y de fácil manejo.



WO 2015/119491 A1

**PROCESO DE OBTENCION DE UN COMPUESTO DE ASPERSION
CELULAR DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS HUMANOS EN
SOLUCION Y SU USO COMO AGENTE REGENERATIVO DE LESIONES
CUTÁNEAS**

5

DESCRIPCIÓN

OBJETO DE LA INVENCION

El objetivo radica en un proceso de obtención de un compuesto de
10 aspersion celular de fibroblastos y queratinocitos humanos y su uso como
agente regenerativo de lesiones cutáneas, preferentemente de úlceras
diabéticas, quemaduras de 1er, 2do y 3er grado y un sustituto de la técnica de
la utilización de colgajos. Dicho compuesto de aspersion celular de fibroblastos
y queratinocitos humanos aumenta la eficiencia de aplicación y la facilidad de la
15 misma, con el fin de ser una alternativa económica, rápida y de fácil manejo.

ANTECEDENTES

En la actualidad el uso de injertos alogénicos y xeno transplantes limita la
regeneración de la piel debido a procesos inflamatorios que se originan por el
20 rechazo inmunológico que implica el uso de piel de donantes y el uso de piel
proveniente de animales. Esto origina la la baja disponibilidad de dicho
material biológico para el tratamiento de heridas cutáneas y existe el
inconveniente de la susceptibilidad a infecciones. Actualmente existen
patentes de técnicas de impresión de células humanas vivas denominadas
25 Bioprinting donde se imprimen fibroblastos y queratinocitos sobre heridas
cutáneas. Esta técnica está basada en depositar mecánicamente por medio de

un brazo robótico (con libertad de moverse en los 3 ejes dimensionales) células autólogas sobre la herida. Sumando a esto podemos encontrar en el mercado sustitutos dérmicos basados en el cultivo in vitro de queratinocitos humanos sobre matrices de piel decelularizadas de origen bovino. Su uso se basa solo
5 en el incremento en el tiempo de cicatrización de la herida mediante el trasplante de esta matriz decelularizada de origen bovino con queratinocitos humanos previamente sembradas sobre su superficie.

Sin embargo, además de utilizarse un producto de origen animal (matriz decelularizada) que no es 100% compatible con el ser humano, el uso y
10 trasplante de este producto se basa solo en incrementar el uso de epitelización y regeneración de la herida y omite la regeneración de la funcionalidad de dicha piel para crear nuevamente la pigmentación e inducción de cabello. Sumado a esto, un trauma severo ocasionado a este órgano (piel) puede ocasionar una regeneración parcial o incompleta y un atrofia mediante el
15 uso de estas mallas con queratinocitos y una falta total para la generación de color y cabello. Otro enfoque para la epitalización y regeneración de la herida que se ha desarrollado en laboratorio se basa en el cultivo in vitro de queratinocitos humanos sobre capas de fibroblastos provenientes de embriones de ratón con alto grado de proliferación. Este sistema creado in vitro
20 presenta desventajas como la baja producción de matriz extracelular del bio injerto creado, un tamaño bidimensional muy limitado en grosor y soporte para cubrir la zona dañada como barrera protectora a la herida, y sobre todo omite también la regeneración de la funcionalidad de la piel durante la cicatrización de la herida. (Pigmentación e inducción de cabello)

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a un proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, preferentemente fibroblastos y queratinocitos humanos autólogos y/o alogénicos suspendidos en una solución y su uso como agente regenerativo de lesiones cutáneas, el cual comprende de las siguientes etapas::

10

a) Separación de la dermis y la epidermis.

- Obtener una muestra de piel de paciente en condiciones estériles por medio de un dermatoma para obtener una lámina de piel, preferentemente de 0.015 pulgadas. Posteriormente, lavar la muestra de piel al menos 3 veces con una
- 15 solución salina de fosfatos (PBS) 1X conteniendo 10% v/v de una solución de antibiótico/antimicótico. Después, lavar al menos 3 veces con una solución de PBS 1X conteniendo 1% v/v de antibiótico/antimicótico. Preferentemente, la solución de antibiótico/antimicótico es estreptomicina/penicilina. Después del lavado de la muestra de piel, incubar con una enzima proteolítica de
- 20 disgregación celular, preferentemente dispasa, a una concentración de 1.79 unidades/mg en condiciones de temperatura de 4°C por al menos 16 horas para obtener una capa de epidermis y una capa de dermis. Al cabo de las 16 horas, separar las dos capas mediante el uso de pinzas estériles y se colocar dichas capas en contenedores estériles e independientes.

b) Incubación de la capa epidermis.

Separar y lavar la capa de epidermis en un contenedor independiente al menos
5 3 veces con la solución PBS 1X e incubar dicha capa de epidermis en una
solución de tripsina a una concentración de 0.025% de tripsina en un volumen
final de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) por 20 minutos a una
temperatura de 37 °C para obtener una epidermis tripsinizada.

10 c) Disgregación de la capa de dermis y proliferación de fibroblastos

Colocar la capa de dermis en un contenedor y disgregar mecánicamente con
una herramienta pulso cortante en condiciones estériles para obtener pedazos
de dermis como máximo de 1mm x 1mm, e incubar por un periodo de al menos
10 minutos, agregar cuidadosamente 33.33% del volumen del contenedor de
15 un medio de cultivo celular para fibroblastos por las paredes del contenedor y
evitar mover los fragmentos de la dermis e incubar a 37 °C, 95% de humedad
relativa, 5% CO₂ y 20% O₂ por un periodo de para obtener fibroblastos en
monocapa.

20 d) Disgregación de la capa de epidermis.

Neutralizar la epidermis tripsinada con 50% de un medio de cultivo de
queratinocitos humanos conteniendo Suero bovino fetal al 10% y agitar
vigorosamente por al menos 30 segundos para obtener una solución celular.
Posteriormente, filtrar la solución celular por un filtro de nitrocelulosa con un

tamaño de poro de 40µm para obtener los queratinocitos humanos en suspensión en el producto filtrado.

e) Proliferación de los queratinocitos en suspensión.

Sembrar la suspensión de queratinocitos en monocapa en condiciones asépticas en un contenedor con un medio de cultivo celular e incubar a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% CO₂ y 20% O₂ por un periodo de 2 a 4 semanas bajo condiciones asépticas, y cambiar el medio de cultivo celular cada segundo o tercer día hasta llegar a una confluencia del 100% para queratinocitos para obtener mayor cantidad de queratinocitos en monocapa.

f) Preparación de la solución del agente reticulante de reacción de la solución de aspersión celular

Generar en condiciones asépticas 15ml de trombina bovina de pulmón al 27% v/v a una concentración de 11U/ml en cloruro de sodio al 0.9% v/v y cargar 15ml del agente reticulante de reacción en una jeringa de 15 cc para obtener el agente reticulante de reacción de la solución de aspersión celular.

g) Preparación de la solución de aspersión celular

Centrifugar a 400 g por 5 minutos una 50cc de sangre periférica autóloga, preferentemente plaquetas humanas (proveniente de toma de muestra del paciente) o crio preservado de plaquetas (banco de sangre) para obtener 15 % v/v de suero acelular plasmático y resuspender con 10×10^6 fibroblastos en

monocapa y 10×10^6 queratinocitos en monocapa y cargar 15ml de la solución de aspersión celular en una jeringa de 15 cc y mezclar dicho compuesto de aspersión celular con la solución de aspersión celular con la implementación de un aspersor fibrijet para obtener un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos.

EJEMPLO 1. MODO PREFERENCIAL DE EMPLEO DEL COMPUESTO DE ASPERSIÓN CELULAR DE QUERATINOCITOS Y FIBROBLASTOS HUMANOS SOBRE LESIONES CUTÁNEAS.

Conectar la jeringa de 15cc con el compuesto de aspersión celular y la jeringa de 15cc con el agente reticulante de reacción de la solución de aspersión celular al aspersor fibrijet. Conectar el aspersor fibrijet a la unidad de regulador de aire comprimido. Conectar el regulador de aire comprimido a una fuente de alimentación de aire comprimido a 25psi/1.75 bar. Colocar el fibrijet a una distancia no menor a de 3cm sobre la superficie del tejido.

Abrir la fuente de aire comprimido y empujar el émbolo de ambas jeringas al mismo tiempo para la pulverización de los queratinocitos y fibroblastos humanos.

Alternativamente el compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos se prepara 15% v/v de una solución compuesta de 225

gramos /ml de fibrinógeno de sangre de bovino disuelto en buffer de fosfato salino a una concentración de 1x.

Alternativamente el compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos se puede obtener utilizando el producto de fibrinógeno de donador humano mediante el producto denominado "Tissucol" de laboratorios Baxter.

Alternativamente la solución del agente reticulante de reacción de la solución de aspersión se obtiene cargando una jeringa de 15cc con CaCl_2 al 1% v/v.

Alternativamente la solución del agente reticulante de reacción de la solución de aspersión se puede obtener utilizando el producto de trombina humana de donador denominado "Tissucol" de laboratorios Baxter.

EJEMPLO 2. MODO PREFERENCIAL DE LA INVENCION.

El compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos autólogo y/o de donador está compuesta por una solución de aspersión celular y una solución de agente reticulante de reacción de la solución de aspersión celular que al momento de la pulverización a presión se combinaran ambas moléculas para encapsular las células vivas las cuales se depositarán sobre la superficie del tejido y formarán sobre esta una película y/o relleno gelificante con células vivas en su interior para la generación de nueva matriz extracelular.

EJEMPLO 3. MODO DE MANIPULACIÓN DEL COMPUESTO DE ASPERSIÓN CELULAR.

En condiciones de quirófano se realiza el proceso de aspersión celular mediante la pulverización simultánea de 2 soluciones por un dispositivo médico (aplicador de gas fibrijet-micromedics) para generar una película gelificante y/o relleno sobre la herida o lesión cutánea como tratamiento de re-epitelización y potencializador de la regeneración de la piel mediante la encapsulación de células vivas sobre la película gelificante.

EJEMPLO 4. USO PREFERENCIAL DE LA INVENCION.

En condiciones de quirófano se realiza el proceso de aspersión celular el cual consiste en 2 soluciones pulverizadas al mismo tiempo por un dispositivo médico (aplicador de gas fibrijet-micromedics) para generar una película gelificante y/o relleno sobre la herida o lesión cutánea con células vivas encapsuladas como tratamiento de re-epitelización.

El dispositivo médico (aplicador de gas fibrijet-micromedics) contendrá dos jeringas (de 5 cc) con las dos soluciones a reaccionar: solución de aspersión celular (fibrinógeno, fibroblastos y queratinocitos) y la solución del agente reticulante de reacción (trombina) de la solución de aspersión celular.

La aspersión se hará directamente sobre la herida cutánea a no menos 3 cm de distancia a través del dispositivo médico (aplicador de gas fibrijet-micromedics).

conectado a un suministro de aire comprimido. La presión necesaria para ejercer la pulverización será de 25PSI /1.75 bar de aire comprimido que empujará las dos jeringas y pulverizará su contenido con finas gotas sobre la herida obteniendo una película gelificante de fibrina conteniendo fibroblastos y queratinocitos que promoverá la producción de matriz extracelular nueva sobre la herida. Para obtener un proceso de pulverización con gotas gruesas, la pulverización será de 15PSI / 1.0 bar de aire comprimido. Por consiguiente, este proceso otorgará una re-epitelización de la herida en un tiempo corto, una re-organización de tejido y una regeneración temprana de la lesión evitando la exposición a infecciones.

El compuesto de aspersion celular de fibroblastos y queratinocitos humanos que está en contacto con la lesión cutánea, proveerá con el transcurso del tiempo una re-epitelización y una regeneración más pronta por la adición de los fibroblastos vivos incrustados dentro de esta red de fibrina (fibrinógeno humano, plasma acelular humano, fibrinógeno bovino) estimulando nueva generación de matriz extracelular y fibras de colágeno.

REIVINDICACIONES

Habiendo descrito suficiente mi invención, considero como una novedad y por lo tanto reclamo como de mi exclusiva propiedad, lo contenido en las siguientes cláusulas:

1. Un proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos caracterizado porque se comprende de las siguientes etapas:
 - a) **Separación de la dermis y epidermis,**
 - b) **incubación e la capa de epidermis,**
 - c) **disgregación de la capa de dermis y proliferación de fibroblastos,**
 - d) **disgregación de la capa de epidermis,**
 - e) **proliferación de los queratinocitos en suspensión,**
 - f) **preparación de la solución del agente reticulatne de reacción de la solución de aspersión celular, y**
 - g) **preparación de la solución de aspersión celular.**
2. El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa a) se obtiene una muestra de piel de un paciente en condiciones estériles por medio de un dermatoma para obtener una lámina de piel; posteriormente, se lava la muestra de piel al menos 3 veces con una solución salina de fosfatos

(PBS) 1X conteniendo 10% v/v de antibiótico/antimicótico; después, lava al menos 3 veces con una solución de PBS 1X conteniendo 1% v/v de antibiótico/antimicótico; después del lavado de la muestra de piel, se incuba con una enzima proteolítica de disgregación celular, a una concentración de 1.79 unidades/mg en condiciones de temperatura de 4°C por al menos 16 horas para obtener una capa de epidermis y una capa de dermis; al cabo de las 16 horas, separar las dos capas mediante el uso de pinzas estériles y se colocar dichas capas en contenedores estériles e independientes.

3. El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la lámina de piel es preferentemente de 0.015 pulgadas.
4. El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la solución antibiótico/antimicótico es preferentemente estreptomycin/penicilina.
5. El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la enzima es preferentemente dispasa.

6. El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa b), se separar y se lava la capa de epidermis en un contenedor independiente al menos 3 veces con la solución PBS 1X y se incuba dicha capa de epidermis en una solución de tripsina a una concentración de 0.025% de tripsina en un volumen final de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) por 20 minutos a una temperatura de 37 °C para obtener una epidermis tripsinizada.
7. El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa c), se coloca la capa de dermis en un contenedor y se disgrega mecánicamente con una herramienta pulso cortante en condiciones estériles para obtener pedazos de dermis como máximo de 1mm x 1mm, y se incuba por un periodo de al menos 10 minutos, se agrega cuidadosamente 33.33% del volumen del contenedor de un medio de cultivo celular para fibroblastos por las paredes del contenedor y se evita mover los fragmentos de la dermis y se incuba a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% CO₂ y 20% O₂ por un periodo de para obtener fibroblastos en monocapa.
8. El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa d), se neutraliza la

epidermis tripsinizada con 50% de un medio de cultivo de queratinocitos humanos conteniendo Suero bovino fetal al 10% y agitar vigorosamente por al menos 30 segundos para obtener una solución celular, posteriormente, se filtra la solución celular por un filtro de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 40µm para obtener los queratinocitos humanos en suspensión en el producto filtrado.

9. El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa e), se siembra la suspensión de queratinocitos en monocapa en condiciones asépticas en un contenedor con un medio de cultivo celular e incubar a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% CO₂ y 20% O₂ por un periodo de 2 a 4 semanas bajo condiciones asépticas, y se cambia el medio de cultivo celular cada segundo o tercer día hasta llegar a una confluencia del 100% para queratinocitos para obtener mayor cantidad de queratinocitos en monocapa.

10. El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa f), se genera en condiciones asépticas 15ml de trombina bovina de pulmón al 27% v/v a una concentración de 11U/ml en cloruro de sodio al 0.9% v/v y cargar 15ml del agente reticulante

de reacción en una jeringa de 15 cc para obtener el agente reticulante de reacción de la solución de aspersión celular.

11.El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque en la etapa g), se centrifuga a 400 g por 5 minutos una 50 cc de sangre periférica autóloga para obtener 15 % v/v de suero acelular plasmático y se resuspende con 10×10^6 fibroblastos en monocapa y 10×10^6 queratinocitos en monocapa y se carga 15ml de la solución de aspersión celular en una jeringa de 15 cc y mezclar dicho compuesto de aspersión celular con la solución de aspersión celular con la implementación de un aspersor fibrijet para obtener un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos.

12.El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la sangre periférica autóloga es preferentemente plaquetas humanas o crio preservado de plaquetas.

13.El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación de la 1 a la 12 como agente regenerativo de lesiones cutáneas.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX2015/000001

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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, A61L, A61F

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, WPIAP, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ES 2377962T T3 (DFB PHARMACEUTICALS INC) 03/04/2012, see the whole document, especially examples 1, 2, 6 and 13.	1, 13
A		2-12
A	ES 2060803T T3 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION CT REGIONAL DE TRANSFUSION SAN) 01/12/1994, see the whole document.	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" 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
15/07/2015

Date of mailing of the international search report
(15/07/2015)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
B. Pérez Esteban

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498484

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX2015/000001

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HARKIN D. G., <i>et al.</i> Optimized delivery of skin keratinocytes by aerosolization and suspension in fibrin tissue adhesive. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society United States 2006 May-Jun 2006 VOL: 14 No: 3 Pags: 354 - 363 ISSN 1067-1927 (Print) Doi: pubmed:16808816. see the whole document, especially materials and methods.	1-13
A	WO 2011144956 A1 (ZAMBRANO BURGL JUAN CARLOS ET AL.) 24/11/2011, see the whole document, especially pages 11 a 15 and claims.	1-13
A	ES 2336430T T3 (CT INVESTIG ENERGETICAS CIEMAT ET AL.) 13/04/2010, see the whole document, especially figure 1.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/MX2015/000001

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2377962T T3	03.04.2012	US2014377229 A1	25.12.2014
		US2013052168 A1	28.02.2013
		US8679475 B2	25.03.2014
		US2012134962 A1	31.05.2012
		US8323638 B2	04.12.2012
		PT1545565E E	05.03.2012
		DK1545565T T3	05.03.2012
		AT535250T T	15.12.2011
		US2011083987 A1	14.04.2011
		US8137965 B2	20.03.2012
		US2006121002 A1	08.06.2006
		US7449333 B2	11.11.2008
		EP2311469 A2	20.04.2011
		EP2311469 A3	08.06.2011
		US2010068281 A1	18.03.2010
		US7879605 B2	01.02.2011
		AU2009240818 A1	17.12.2009
		AU2009240818B B2	16.08.2012
		US2009232791 A1	17.09.2009
		US7700351 B2	20.04.2010
		US2003165482 A1	04.09.2003
		US7144729 B2	05.12.2006
		WO2004022077 A1	18.03.2004
		JP2004121819 A	22.04.2004
		JP4522667B B2	11.08.2010
		EP1545565 A1	29.06.2005
		EP1545565 A4	23.04.2008
		CA2497193 A1	18.03.2004
		AU2003273292 A1	29.03.2004
		AU2003273292B B2	27.08.2009
----- ES2060803T T3	----- 01.12.1994	US5474770 A	12.12.1995
		FR2639958 A1	08.06.1990
		FR2639958 B1	21.08.1992
		EP0373044 A1	13.06.1990
		EP0373044 B1	19.10.1994
		DE68918922T T2	20.04.1995
		DE68918922T T3	11.11.2004
		AT113071T T	15.11.1994
----- WO2011144956 A1	----- 24.11.2011	CL2012003244 A1	18.10.2013
		MX2012013500 A	05.06.2013
		US2013195958 A1	01.08.2013
		CN103003415 A	27.03.2013
		EP2573167 A1	27.03.2013
----- ES2336430T T3	----- 13.04.2010	EP2573167 A4	22.10.2014
		JP2012187412 A	04.10.2012
		JP5529918B B2	25.06.2014
		US2012183505 A1	19.07.2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/MX2015/000001

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		PT1375647E E	18.02.2010
		DK1375647T T3	15.03.2010
		EP2165678 A1	24.03.2010
		AT448295T T	15.11.2009
		JP2008253788 A	23.10.2008
		JP5047047B B2	10.10.2012
		US2007275461 A1	29.11.2007
		US2004171145 A1	02.09.2004
		US7244552 B2	17.07.2007
		TWI258506B B	21.07.2006
		JP2004522545 A	29.07.2004
		JP4235452B B2	11.03.2009
		ES2173812 A1	16.10.2002
		ES2173812 B1	16.12.2003
		WO02072800 A1	19.09.2002
		EG23321 A	29.12.2004
		CA2439387 A1	19.09.2002
		CA2439387 C	24.04.2012
		AU2002235958B B2	10.05.2007
		AR032916 A1	03.12.2003
		EP1375647 A1	02.01.2004
		EP1375647 B1	11.11.2009
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/MX2015/000001

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071 (2010.01)

A61L27/60 (2006.01)

A61F2/10 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/MX2015/000001

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

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, A61L, A61F

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, WPIAP, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	ES 2377962T T3 (DFB PHARMACEUTICALS INC) 03/04/2012, ver todo el documento, especialmente los ejemplos 1, 2, 6 y 13.	1, 13
A		2-12
A	ES 2060803T T3 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION CT REGIONAL DE TRANSFUSION SAN) 01/12/1994, ver todo el documento.	1-13

☒ 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.
15/07/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
15 de julio de 2015 (15/07/2015)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
N° de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
B. Pérez Esteban
N° de teléfono 91 3498484

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/MX2015/000001

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	HARKIN D. G., <i>et al.</i> Optimized delivery of skin keratinocytes by aerosolization and suspension in fibrin tissue adhesive. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society United States 2006 May-Jun 2006 VOL: 14 No: 3 Pags: 354 - 363 ISSN 1067-1927 (Impreso) Doi: pubmed:16808816. Ver todo el documento, especialmente materiales y métodos.	1-13
A	WO 2011144956 A1 (ZAMBRANO BURGL JUAN CARLOS ET AL.) 24/11/2011, ver todo el documento, especialmente páginas 11 a 15 y reivindicaciones.	1-13
A	ES 2336430T T3 (CT INVESTIG ENERGETICAS CIEMAT ET AL.) 13/04/2010, ver todo el documento, especialmente figura 1.	1-13

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/MX2015/000001

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2377962T T3	03.04.2012	US2014377229 A1	25.12.2014
		US2013052168 A1	28.02.2013
		US8679475 B2	25.03.2014
		US2012134962 A1	31.05.2012
		US8323638 B2	04.12.2012
		PT1545565E E	05.03.2012
		DK1545565T T3	05.03.2012
		AT535250T T	15.12.2011
		US2011083987 A1	14.04.2011
		US8137965 B2	20.03.2012
		US2006121002 A1	08.06.2006
		US7449333 B2	11.11.2008
		EP2311469 A2	20.04.2011
		EP2311469 A3	08.06.2011
		US2010068281 A1	18.03.2010
		US7879605 B2	01.02.2011
		AU2009240818 A1	17.12.2009
		AU2009240818B B2	16.08.2012
		US2009232791 A1	17.09.2009
		US7700351 B2	20.04.2010
		US2003165482 A1	04.09.2003
		US7144729 B2	05.12.2006
		WO2004022077 A1	18.03.2004
		JP2004121819 A	22.04.2004
		JP4522667B B2	11.08.2010
		EP1545565 A1	29.06.2005
		EP1545565 A4	23.04.2008
		CA2497193 A1	18.03.2004
		AU2003273292 A1	29.03.2004
		AU2003273292B B2	27.08.2009
----- ES2060803T T3	----- 01.12.1994	US5474770 A	12.12.1995
		FR2639958 A1	08.06.1990
		FR2639958 B1	21.08.1992
		EP0373044 A1	13.06.1990
		EP0373044 B1	19.10.1994
		DE68918922T T2	20.04.1995
		DE68918922T T3	11.11.2004
		AT113071T T	15.11.1994
----- WO2011144956 A1	----- 24.11.2011	CL2012003244 A1	18.10.2013
		MX2012013500 A	05.06.2013
		US2013195958 A1	01.08.2013
		CN103003415 A	27.03.2013
		EP2573167 A1	27.03.2013
		EP2573167 A4	22.10.2014
----- ES2336430T T3	----- 13.04.2010	JP2012187412 A	04.10.2012
		JP5529918B B2	25.06.2014
		US2012183505 A1	19.07.2012

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/MX2015/000001

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		PT1375647E E	18.02.2010
		DK1375647T T3	15.03.2010
		EP2165678 A1	24.03.2010
		AT448295T T	15.11.2009
		JP2008253788 A	23.10.2008
		JP5047047B B2	10.10.2012
		US2007275461 A1	29.11.2007
		US2004171145 A1	02.09.2004
		US7244552 B2	17.07.2007
		TWI258506B B	21.07.2006
		JP2004522545 A	29.07.2004
		JP4235452B B2	11.03.2009
		ES2173812 A1	16.10.2002
		ES2173812 B1	16.12.2003
		WO02072800 A1	19.09.2002
		EG23321 A	29.12.2004
		CA2439387 A1	19.09.2002
		CA2439387 C	24.04.2012
		AU2002235958B B2	10.05.2007
		AR032916 A1	03.12.2003
		EP1375647 A1	02.01.2004
		EP1375647 B1	11.11.2009
-----	-----	-----	-----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C12N5/071 (2010.01)

A61L27/60 (2006.01)

A61F2/10 (2006.01)