

**PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN SUSTITUTO DÉRMICO FUNCIONAL A
PARTIR DE MEMBRANA AMNIÓTICA DESCELULARIZADA PROVENIENTE DE
PLACENTA EN COMBINACIÓN CON QUERATINOCITOS Y SU USO COMO
AGENTE DE REGENERACIÓN TISULAR DE PIEL**

5

DESCRIPCIÓN

OBJETO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es un proceso para la generación de un
10 injerto de piel artificial en laboratorio utilizando técnicas especializadas en
biotecnología como es el cultivo de células de tejidos, preferentemente humanas en el
cual se cultivan en condiciones asépticas los queratinocitos que forman parte de la
capa epidérmica de la piel, los cuales se combinan con una malla rica en colágeno
(proteína estructural de todos los tejidos del cuerpo) la cual se obtiene a partir de
15 células que componen la estructura de la piel en combinación con membrana
amniótica obtenida de placenta para generar dos capas en laboratorio que puede
utilizarse en pacientes quemados o con lesiones en la piel.

El objeto de la invención radica en un método para generar un sustituto
20 dérmico funcional compuesto por membrana amniótica descelularizada en
combinación con células epidérmicas de piel (queratinocitos) proveniente de prepucio
neonatal (células alogénicas) o de tejido del propio paciente (células autólogas), o el
método para generar un apósito biológico a partir de la misma descelularización de la
membrana amniótica sin cultivo de queratinocitos, que funcionará el primero como
25 sustituto dérmico y el segundo como una cobertura o apósito biológico para la
regeneración y tratamiento de heridas de espesor parcial y/o total causadas por
quemaduras, úlceras diabéticas o cualquier lesiones en la piel. Este diseño está
basado en la técnica de bio ingeniería tisular de tejidos creados en laboratorio y su
formulación se basa principalmente por una matriz rica en colágeno tipo 1 flexible
30 obtenida a partir del proceso de descelularización de la membrana amniótica obtenida
de placentas de mamífero, preferentemente humanas de 36-38 semanas de gestación

pre cultivada con queratinocitos humanos en su superficie para la generación de un sustituto dérmico de piel para la re epitelización y cicatrización de lesiones cutáneas, que en conjunto estimularán una pronta regeneración y/o reconstrucción del tejido cutáneo mediante la formación de nueva matriz extracelular (dermis-epidermis).

- 5 Adicionalmente esta tecnología reduce considerablemente el costo del tratamiento comparado con el costo de los métodos actuales como los tratamientos de injertos de piel (autoinjertos o aloinjertos) y el resultado de este proceso es una pronta reorganización celular, remodelación y re-epitelización de la herida originando la formación de nuevo tejido cutáneo y evitando la formación de tejido fibrótico resultado
- 10 de la contracción muscular.

ANTECEDENTES

- En la actualidad el uso de injertos alogénicos y xenotransplantes limita la regeneración de la piel debido a procesos inflamatorios que se originan por el rechazo
- 15 inmunológico que implica el uso de piel de donantes y el uso de piel proveniente de animales. Esto origina la baja disponibilidad de dicho material biológico para el tratamiento de heridas cutáneas y existe el inconveniente de la susceptibilidad a infecciones. Dentro de Ingeniería de tejidos la regeneración se inicia generalmente con la aplicación de una matriz biodegradable o "andamio biológico" con una
- 20 estructura porosa, trabecular o reticular, que se coloca en el tejido dañado para promover, en el microambiente apropiado, el crecimiento y propagación in situ de las células residentes sanas circundantes o bien de células madre que pueden implantarse en ese tejido o estar incorporadas al biomaterial que integra el "andamio biológico", con la finalidad de acelerar la regeneración. En esta combinación, las
- 25 células vivas suministran los componentes biológicos, mientras que el material del "andamio" sirve para apoyar y favorecer la proliferación celular (Dong, et al., 2004; Muschler, 2004); mientras que el tratamiento con células madre ha dado lugar a un nuevo tipo de tratamiento que se puede catalogar como terapia celular regenerativa y que en la actualidad es uno de los temas más excitantes de la medicina
- 30 contemporánea y persiste como una tendencia activa dentro de la investigación en medicina regenerativa (Hernández-Ramírez, 2009). Con respecto al desarrollo y

tecnologías de sustitutos dérmicos se encuentra la patente **US9888999B2** que consiste en un aloinjerto acelular y su proceso de preparación a partir de dermis de humano recién fallecido, autoinjerto o xenoinjertos. La remoción de células se logra por medio de dos detergentes y posteriormente se trata con rayos gamma. La patente

5 **CN102580153B** se refiere a un método para producir aloinjertos de matrices dérmicas acelulares que consiste en el procesamiento de pieles animales como lo es la inactivación, el desengrasado, descelularización, empaquetado e irradiación para su desinfección. En tema de apósitos biológicos, existe la patente de origen china **CN100408107C** que se prepara a partir de material de animal incluyendo membrana

10 amniótica, donde se trata el material hasta lograr remover los componentes que podrían causar rechazo por parte del receptor. Una aplicación de patente, **US20130289724A1** describe el uso de membrana amniótica y corion como un apósito biológico, la cual consiste en al menos una capa de tejido de membrana amniótica o corión y una capa con adhesivo que estará en contacto directamente con la herida. Se

15 encontró también una solicitud de patente americana **US20050107876A1** que detalla un sustituto dérmico que comprende el polímero biodegradable tal como colágeno y el biomaterial tal como membrana amniótica, el método de preparación y el uso de los mismos. El sustituto dérmico de la invención se puede aplicar sobre las heridas que requieren injerto de piel, por ejemplo, quemaduras graves. El sustituto dérmico con

20 membrana amniótica en lugar de una membrana de silicona tiene varias ventajas, tales como una mejor bio compatibilidad, actividad antiinflamatoria y promoción de la actividad de curación de heridas y utilización comercial como membrana basal. Además, la estructura se puede utilizar como matriz básica para cultivo de células. Asimismo, existe una solicitud internacional con número WO2009156398A1 que

25 detalla un método ex vivo para obtener una población de queratinocitos humanos derivados de células madre pluripotentes de mamífero, preferentemente humanas. Esta comprende una etapa de co-cultivo de células madre pluripotentes de mamífero, preferentemente humanas con células que favorecen la diferenciación ectodérmica en presencia de un agente que estimula la inducción epidérmica y un agente que

30 estimula la diferenciación terminal de los queratinocitos. Esta revisión tecnológica lleva a la conclusión de que la presente solicitud posee novedad a nivel mundial

debido a que ninguna de las tecnologías encontradas presenta las mismas características. Además, el proceso propuesto tiene ventajas adicionales a las patentes anteriormente mencionadas.

Sumado a esto, podemos encontrar en el mercado otros productos basados en el cultivo in vitro de queratinocitos humanos sobre latices de colágeno bovino tipo 1 previamente sembrados con fibroblastos humanos (Apligraf).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1: Se muestra en la fotografía el método de separación de la membrana amniótica (Amnio) a partir de la placenta humana. La membrana amniótica es una cobertura que rodea todo el tejido placentario.

Figuras 2: Muestra una fotografía de membrana amniótica separada y aislada de la placenta.

Figuras 3: Muestra una fotografía del cultivo queratinocitos humanos neonatales (alogénicos) sobre membrana amniótica descelularizada sobre la superficie en condiciones de esterilidad y caja de cultivo.

Figura 4. Muestra una fotografía del cultivo queratinocitos humanos sobre membrana amniótica descelularizada sobre la superficie en condiciones de esterilidad y en caja de cultivo con queratinocitos del propio paciente (autólogos).

Figura 5: Muestra una fotografía del sustituto dérmico o membrana amniótica colocada en gasa vaselinada para su fácil manejo y transporte.

Figura 6: Muestra una fotografía de un corte histológico de hematoxilina y eosina del sustituto dérmico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la generación biotecnológica de un sustituto dérmico funcional a partir de la descelularización de membrana amniótica de placenta de mamífero, preferentemente humana, en combinación con queratinocitos (alogénicos o autólogos), y su uso como sustituto dérmico en el tratamiento y manejo de heridas, y a su vez, su uso como apósito o cobertura biológica a partir del uso solo de la membrana amniótica descelularizada sin

queratinocitos de mamífero, preferentemente humanos; ambos injertos usados para la regeneración y tratamiento de heridas de espesor parcial y/o total causadas por quemaduras, úlceras diabéticas o cualquier lesiones en la piel, el cual se comprende de las siguientes etapas:

5

a) Obtención y descelularización de una membrana amniótica a partir de placenta de mamífero, preferentemente humana.

Se obtiene una membrana amniótica (amnio) separando del corión o saco embrionario de la placenta de mamífero, preferentemente humana, a partir de 28-38
10 semanas de gestación, como se muestra en la figura 1 y en la figura 2.

Posteriormente, lavar la membrana amniótica al menos 3 veces con una solución salina de fosfatos (PBS) 1X conteniendo de 1-10% v/v de una solución de antibiótico/antimicótico preferentemente penicilina-estreptomicina-gentamicina y se incuba por al menos 16 horas de 2-10 grados centígrados.

15 Posteriormente, al cabo de al menos 16 horas, se secciona mecánicamente o se corta la membrana amniótica en trozos de 1cm x 1cm y hasta 15 x 15 cm.

Incubar las secciones de membrana amniótica en un componente tensioactivo aniónico preferentemente en una solución de Dodecilsulfato sódico (SDS) a una concentración de 0,03 % - 0,050% (p/v) disuelta en una solución tamponada de buffer
20 de fosfatos 1x (p/v) e incubar de 20 a 27 horas a una temperatura de 15 a 37 grados centígrados.

Retirar la solución de dodecilsulfato sódico (SDS) y lavar por al menos 3 veces con una solución de tamponada de buffer de fosfatos 1x (p/v).

Incubar, por al menos 16 horas las secciones de membrana amniótica en una
25 solución enzimática de DNAsa de 0,025% a 0,050% (p/v) compuesta por solución tamponada de buffer de fosfatos al 1x (p/v), cloruro de magnesio de 10mM a 20mM y con pH de 7 a 8.

Lavar por al menos 3 veces con una solución tamponada de buffer de fosfatos al 1x (p/v) al 1% de una solución de antibiótico-antimicótico preferentemente
30 penicilina-estreptomicina-gentamicina.

Posteriormente, resuspender las membranas amnióticas en un crioprotector compuesto por Glicerol a una disolución de 50 a 85% con una solución de medio de cultivo celular preferiblemente DMEM (dubelcco's modified Eagle medium) alto en glucosa (4500mg/L), 25mM Hepes, al 1% de una solución de antibiótico-antimicótico preferentemente penicilina-estreptomicina-gentamicina y congelar las membranas amnióticas a una temperatura de -20 a -90 grados centígrados.

Opcionalmente se pueden incubar las secciones de membrana amniótica en una solución de Dodecilsulfato sódico (SDS) a una concentración de 0,03 % al 0,050% (p/v) disuelta en una solución tamponada de buffer de fosfatos 1x (p/v) y de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a una concentración de 0.1% a 0.5% (p/v) e incubar de 20 a 27 horas a una temperatura de 15 a 37 grados centígrados.

Alternativamente, las membranas amnióticas se resuspenden en un crioprotector compuesto por DMSO a una disolución de 50% al 85% con una solución de medio de cultivo celular preferiblemente medio RPMI, solución Hank's, F-12, solución salina de cloruro de sodio al 0,9%, o una solución tamponada de buffer de fosfatos 1x todos al 1% de una solución de antibiótico-antimicótico preferentemente penicilina-estreptomicina-gentamicina y congelar las membranas amnióticas a una temperatura de -20 a -90 grados centígrados.

b) Obtener Queratinocitos alogénicos a partir de prepucio neonatal o queratinocitos autólogos a partir de una muestra de mamífero, preferentemente humano.

Obtener una muestra de piel de mamífero, preferentemente humano en condiciones estériles por medio de un dermatoma para obtener una lámina de piel, preferentemente de 0.015 pulgadas o por medio de un *skin punch* (sacabocados) preferentemente de 2mm a 8mm, u obtener un prepucio neonatal sano por donación.

Posteriormente, lavar la muestra de tejido al menos 3 veces con una solución tamponada de buffer de fosfatos (PBS) al 1X conteniendo 10% v/v de una solución de antibiótico/antimicótico preferentemente penicilina-estreptomicina-gentamicina. 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 será penicilina-estreptomicina-gentamicina.

Después del lavado de la muestra de piel, incubar con una enzima proteolítica de disgregación celular, preferentemente dispasa, a una concentración de 1.79 a 5 unidades/mg e incubar a 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 mecánicamente y colocar en contenedores estériles e independientes.

Separar y lavar la capa de epidermis en un contenedor independiente al menos 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 al menos 5 minutos a una temperatura de 37 °C para obtener una epidermis tripsinada.

Neutralizar la epidermis tripsinada con 10%-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 de mamífero, preferentemente humanos en suspensión en el producto filtrado.

Opcionalmente, en lugar se pueden utilizar células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo, sangre periférica, médula ósea, líquido amniótico, cotiledones de placenta, pulpa dental, para el recubrimiento de la membrana amniótica para la generación de un sustituto dérmico funcional.

c) Proliferación in vitro de los queratinocitos en suspensión.

Sembrar los queratinocitos en suspensión en un frasco de cultivo celular revestido con colágeno tipo 1 con un medio de cultivo celular para queratinocitos preferentemente un medio nutritivo suplementado con extracto de pituitaria bovina (BPE) 0.1-0.4% (v/v), factor de crecimiento epidermal de mamífero, preferentemente humano y recombinante (EGF) 0.125 a 0.2 ng/ml Insulina de mamífero, preferentemente humana 1 a 5 mg/ml, hidrocortisona 0.1 a 0.33 mg/ml, transferrina de

mamífero, preferentemente humana 1-10 mg/ml Epinefrina 0.1 a 0.39 mg/ml y cloruro de calcio (CaCl_2) 0.15 a 0.2 mM.

Incubar a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% CO_2 y 20% O_2 por un periodo de al menos 2 semanas para obtener una cantidad de $10\text{-}50 \times 10^6$ de queratinocitos en monocapa, como se muestra en la figura 3 y figura 4.

d) Preparación del sustituto dérmico funcional

Descongelar la membrana amniótica a temperatura ambiente y lavar por al menos 3 veces con una solución tamponada de buffer de fosfatos (PBS) al 1X conteniendo 1% v/v de una solución de antibiótico/antimicótico preferentemente penicilina-estreptomicina-gentamicina y colocar en una caja de cultivo celular.

Posteriormente, lavar con PBS 1X el contenedor que contiene los queratinocitos en monocapa por al menos 2 veces e incubar por al menos 5 minutos con una solución de 0.025% a 0.05% de tripsina en un volumen final de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a una temperatura de 37 °C. Neutralizar la solución de tripsinización agregando 50% del volumen del contenedor con medio nutritivo especial para queratinocitos suplementado con extracto de pituitaria bovina (BPE) 0.1 a 0.4% (v/v), factor de crecimiento epidermal de mamífero, preferentemente humano y recombinante (EGF) 0.125 a 0.2 ng/ml Insulina de mamífero, preferentemente humana 1-5 mg/ml, hidrocortisona 0.1 a 0.33 mg/ml, transferrina de mamífero, preferentemente humana 1-10 mg/ml Epinefrina 0.1 a 0.39 mg/ml y cloruro de calcio (CaCl_2) 0.15-0.2 mM, al 10-20% v/v de suero autólogo o suero bovino fetal grado farmacéutico para obtener queratinocitos en suspensión. Colocar el 100% del volumen de los queratinocitos en suspensión en un contenedor y centrifugar a 1,500 revoluciones por minutos por al cabo de 5 a 10 minutos para obtener un pellet celular de queratinocitos.

Resuspender el pellet celular de queratinocitos en 1 a 10 ml de medio de cultivo celular especial para queratinocitos, contar en cámara de Neubauer a una dilución 1:1 con azul de metileno y sembrar los queratinocitos en suspensión sobre la membrana amniótica descelularizada con una densidad de 5,000-50,000,000 queratinocitos por centímetro cuadrado e incubar a 37 °C, 95% de humedad relativa,

5% CO₂ y 20% O₂ por un periodo de 1 a 2 semanas para la generación de un sustituto dérmico funcional con estratificación de queratina en la superficie de la membrana amniótica. Esta incubación de la membrana amniótica con los queratinocitos se realiza en un frasco, *Petri dish* (caja Petri) o contenedor estéril destinado al cultivo de tejidos estático o mediante el proceso de air-liquid interface (interfaz de aire líquido) para la generación de la estratificación de la epidermis sobre la superficie de la membrana amniótica descelularizada, para obtener el sustituto dérmico funcional, como se muestra en la figura 5 y en la figura 6.

Opcionalmente, previo al sembrado de queratinocitos en suspensión, la membrana amniótica descelularizada se recubre con una solución de colágeno tipo 1 en agua grado estéril a una concentración de 0.01% a 0.1% e incubar a temperatura ambiente o 37 grados centígrados previo al sembrado de los queratinocitos.

También, la membrana amniótica descelularizada puede ser revestida o cultivada con células madre limbares de la periferia de la córnea de mamífero, preferentemente humana.

EJEMPLO 1. MODO PREFERENCIAL DE LA INVENCION.

El sustituto dérmico funcional está compuesto por una matriz rica en colágeno tipo 1 que se obtiene a partir de la descelularización de membrana amniótica de placenta humana revestida o cultivada en su superficie con queratinocitos humanos alogénicos o autólogos para generar una estratificación epidérmica previa a su implantación cutánea. Este sustituto dérmico es compuesto por una malla de colágeno flexible a partir de la descelularización con componentes tensioactivo aniónico que eliminarán todas las estructuras, tejidos y líneas celulares de la membrana amniótica para que cause rechazo inmunológico y pueda ser usada como donación, y particularmente presentará una síntesis de queratina en su superficie con estratificación cutánea promovida por los queratinocitos sembrados sobre su superficie la cual será cultivada por al menos 1 mes para generar la epidermis sobre la matriz de colágeno. Este cultivo del sustituto dérmico funcional puede ser en condiciones estáticas dentro de un frasco de cultivo o Petri dish (caja Petri) o mediante el método conocido de *liquid-air interface* (interfaz de aire líquido) a partir de

un frasco de cultivo tipo transwell en una incubadora que proporcione las condiciones de 90% de humedad, 5% de CO₂ a 37 grados centígrados

EJEMPLO 2. MODO DE MANIPULACIÓN DEL SUSTITUTO DÉRMICO FUNCIONAL

5 En condiciones asépticas, se abre el frasco de cultivo celular colocado horizontalmente, se aspira el medio de cultivo celular y se coloca una gasa vaselinada sobre la superficie del sustituto dérmico para su fácil manipulación. Posteriormente, mediante el uso de pinzas se despega suavemente por las 4 esquinas o a partir de la obtención del sustituto dérmico, se puede transportar en caja Petri estéril y sellada al
10 quirófano para ser implantada en pacientes que presentan lesiones cutáneas.

 A su vez, el sustituto dérmico puede ser mantenido en congelación por mas de 1 año en un rango de -70 C a -100 °C, una vez montada sobre gasa vaselinada dentro de una bolsa tyvek para dispositivo médico e impregnada con una solución de crio protector para ser mantenida en ultra congelador por un periodo de tiempo de mínimo
15 un año. A partir del uso de un sustituto dérmico congelado, se descongela a temperatura ambiente, y en condiciones asépticas en quirófano se abre cuidadosamente la bolsa tyvek y se coloca solución salina o se lava el sustituto dérmico con solución salina de cloruro de sodio al 0.9% (solución fisiológica) para retirar el crio protector para posteriormente colocar el sustituto de piel sobre la lesión a
20 tratar.

 A su vez, la membrana amniótica descelularizada puede ser usada como apósito biológico para la cobertura de heridas abiertas.

EJEMPLO 3. USO PREFERENCIAL DE LA INVENCION.

25 Este sustituto dérmico funcional está basado en la bien orquestada combinación de una malla o matriz de colágeno que se obtiene a partir de la descelularización de la membrana amniótica de placenta humana con el sembrado o crecimiento de queratinocitos humanos sobre su superficie para la generación de un sustituto dérmico, que conforman la piel nativa y funcional mediante la producción de
30 fibras de colágeno tipo I y IV (fibroblastos), producción de queratina (queratinocitos). Todo esto, en combinación con el uso de la membrana amniótica descelularizada que

proporcionará flexibilidad, soporte y manejabilidad al sustituto dérmico (bidimensional) para ser implantado y el cual generará la vascularización al momento de ser implantado, ya que posee factores de crecimiento que estimula la producción de nueva matriz extracelular en las heridas tratadas en los pacientes con patologías cutáneas disminuyendo el tiempo y calidad de re-epitelización de la piel. El sustituto dérmico viene a sustituir el uso de alo, xeno y autoinjertos ya que muchas veces la obtención de piel del mismo paciente o el uso de piel de bancos es limitada o no disponible sin tomar en cuenta el uso de piel de otras especies (origen bovino).

El uso preferencial de esta innovación está basado en la implantación del sustituto dérmico en lesiones cutáneas con la potencialidad de crear nueva matriz extracelular cutánea junto con su funcionalidad del uso de membrana amniótica descelularizada la cual es una malla rica en colágeno que promoverá la producción de dermis cutánea.

Su mecanismo de acción se basa a partir de una lesión cutánea originada por la remoción de tejido canceroso, quemaduras de piel de espesor parcial o total, úlceras diabéticas venosas, remoción de cicatrices cutáneas, etc.

A su vez, la membrana amniótica descelularizada tiene el potencial de uso como apósito biológico sobre heridas o lesiones de la piel al momento de no ser cultivada con queratinocitos humanos, con la finalidad de que funcione como una cobertura y la herida no esté expuesta a infecciones.

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:

- 5 1.- Un proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, **caracterizado porque** se comprende de las etapas
 - a) Obtención y descelularización de una membrana amniótica a partir de placenta de mamífero, preferentemente humana;
 - 10 b) Obtener Queratinocitos alogénicos a partir de prepucio neonatal o queratinocitos autólogos a partir de una muestra del paciente;
 - c) Proliferación in vitro de los queratinocitos en suspensión; y
 - d) Preparación del sustituto dérmico funcional.
- 15 2.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa a) se obtiene una membrana amniótica (amnio) separando del corión o saco embrionario de la placenta de mamífero, preferentemente humana a partir de 30-28 semanas de gestación y se lava la membrana amniótica al menos 3 veces con una
 - 20 solución salina de fosfatos (PBS) 1X conteniendo de 1-10% v/v de una solución de antibiótico/antimicótico preferentemente penicilina-estreptomicina-gentamicina, se incuba por al menos 16 horas de 2-10 grados centígrados y se secciona mecánicamente en trozos de 1cm x 1cm y hasta 15 x 15 cm.
- 25 3.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa a) se descelularizan las secciones de las membranas amnióticas a partir de un proceso de incubación de un componente tensioactivo aniónico preferentemente una solución de Dodecilsulfato sódico (SDS) a una concentración de 0,03 % a 0,050%
 - 30 (p/v) disuelta en una solución tamponada de buffer de fosfatos 1x (p/v) incubándolas por 20 a 27 horas a una temperatura de 15 a 37 grados centígrados, posteriormente

se lavan al menos 3 veces con una solución de tamponada de buffer de fosfatos 1x (p/v), se incuban por un tiempo de al menos 16 horas en una solución enzimática de DNAsa de 0,025% a 0,050% (p/v) compuesta por solución tamponada de buffer de fosfatos al 1x (p/v), cloruro de magnesio 10mM-20mM, con pH de 7 a 8, y finalmente lavándolas al menos 3 veces con una solución tamponada de buffer de fosfatos al 1x (p/v) al 1% de una solución de antibiótico-antimicótico preferentemente penicilina-estreptomicina-gentamicina para crio preservarlas a una temperatura de -20 a -90 grados centígrados a partir de un crio protector compuesto por Glicerol a una disolución de 50% a 85% con medio de cultivo celular preferiblemente DMEM (dubelcco's modified Eagle medium) alto en glucosa (4500mg/L), 25mM Hepes, al 1% de una solución de antibiótico-antimicótico preferentemente penicilina-estreptomicina-gentamicina.

4.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 3, **caracterizado porque** las secciones de membrana amniótica alternativamente se pueden incuban en una solución de Dodecilsulfato sódico (SDS) a una concentración de 0,03 % - 0,050% (p/v) disuelta en una solución tamponada de buffer de fosfatos 1x (p/v) y de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a una concentración de 0.1%-0.5% (p/v) para ser incubadas por un periodo de 20 a 27 horas a una temperatura de 15 a 37 grados centígrados

5.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 4, **caracterizado porque** se obtiene una membrana descelularizada de mamífero, preferentemente humana libre de cualquier línea celular obteniendo una malla de colágeno.

6.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 3 **caracterizado porque** opcionalmente el crio protector puede componerse por DMSO, RPMI, solución Hank's, F-12, solución salina de cloruro de sodio al 0,9%, o una solución tamponada

de buffer de fosfatos 1x todos al 1% de una solución de antibiótico-antimicótico preferentemente penicilina-estreptomicina-gentamicina.

7.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa b) se aíslan queratinocitos humanos a partir de tejido autólogo de una muestra de piel o de tejido alogénico preferentemente prepucio neonatal

8.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa b). se lava la muestra de tejido al menos 3 veces con una solución tamponada de buffer de fosfatos (PBS) al 1X conteniendo 10% v/v de una solución de antibiótico/antimicótico preferentemente penicilina-estreptomicina-gentamicina; después lavar al menos 3 veces con una solución de PBS 1X conteniendo 1% v/v de antibiótico/antimicótico.

9.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 8, **caracterizado porque** la solución antibiótico-antimicótico preferentemente es penicilina-estreptomicina-gentamicina.

10.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa b) se incuba con una enzima proteolítica de disgregación celular, preferentemente dispasa, por al menos 16 horas para obtener una capa de epidermis y una capa de separando las dos capas mecánicamente y colocándolas en contenedores estériles e independientes.

11.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa c) se siembran los queratinocitos en suspensión en un frasco de cultivo celular

revestido con colágeno tipo 1 con un medio de cultivo celular para queratinocitos y se incubaba a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% CO₂ y 20% O₂ por un periodo de para obtener una cantidad de 10 a 50 x 10⁶ de queratinocitos en monocapa.

12.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 11, **caracterizada porque** el medio de cultivo celular preferentemente es suplementado con extracto de pituitaria bovina (BPE) 0.1-0.4% (v/v), factor de crecimiento epidermal de mamífero, preferentemente humano y recombinante (EGF) 0.125- 0.2 ng/ml Insulina de mamífero, preferentemente humana 1-5 mg/ml, hidrocortisona 0.1-0.33 mg/ml, transferrina de mamífero, preferentemente humana 1-10 mg/ml Epinefrina 0.1- 0.39 mg/ml y cloruro de calcio (CaCl₂) 0.15-0.2 mM; incubar a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% CO₂ y 20% O₂ por un periodo de para obtener una cantidad de 10-50 x 10⁶ de queratinocitos en monocapa.

13.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 12, **caracterizada porque** se obtiene una línea pura de queratinocitos in vitro.

14.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizada porque** en la etapa d) se prepara el sustituto dérmico funcional lavando la membrana amniótica descelularizada al menos 3 veces con una solución tamponada de buffer de fosfatos (PBS) al 1X conteniendo 1% v/v de una solución de antibiótico/antimicótico preferentemente penicilina-estreptomycin-gentamicina y colocar en una caja de cultivo celular.

15.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa d) el sustituto dérmico funcional se prepara a partir de sembrar el pellet celular de queratinocitos sobre la membrana amniótica descelularizada con o sin

recubrimiento de colágeno tipo 1 con una densidad mínima de 5,000 queratinocitos por centímetro cuadrado en un frasco, caja Petri o contenedor estéril destinado al cultivo estático de tejidos o mediante el cultivo a partir del proceso de air-liquid interface (interfaz de aire líquido) a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% CO₂ y 20% O₂ por un periodo de 1 a 2 semanas para la generación de la estratificación de la epidermis sobre la superficie de la membrana amniótica descelularizada.

16.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 15, **caracterizado porque** previo a la siembra de los queratinocitos, se recubre la membrana amniótica descelularizada con una solución preferentemente de colágeno tipo 1.

17.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 15, **caracterizado porque** el medio nutritivo para la generación del sustituto dérmico esta suplementado preferentemente con extracto de pituitaria bovina (BPE) 0.1-0.4% (v/v), factor de crecimiento epidermal de mamífero, preferentemente humana y recombinante (EGF) 0.125- 0.2 ng/ml Insulina de mamífero, preferentemente humana 1-5 mg/ml, hidrocortisona 0.1-0.33 mg/ml, transferrina, preferentemente humana 1-10 mg/ml Epinefrina de 0.1 a 0.39 mg/ml y cloruro de calcio (CaCl₂) de 0.15 a 0.2 mM.

18.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con la reivindicación 15, **caracterizado porque** la incubación de la membrana amniótica descelularizada con los queratinocitos preferentemente puede realizarse en una caja Petri, contenedor o frasco estéril destinado a cultivo de tejidos estático o mediante el proceso de air-liquid interface (interfaz de aire líquido) para la generación de la estratificación de la epidermis sobre la superficie de la membrana amniótica descelularizada.

19.- Uso del sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos obtenido

mediante el proceso comprendido en las reivindicaciones 1 a 18 como agente de reepitalización de lesiones cutáneas.

20.-.- El proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos, de conformidad con las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado porque** la membrana amniótica descelularizada por si sola puede usarse como cobertura biológica, apósito cutáneo o wound dressing (cobertura para heridas) sobre lesiones cutáneas.

10

15

20

25

30

RESUMEN

La presente invención provee un proceso de obtención de un sustituto dérmico funcional a partir de membrana amniótica descelularizada proveniente de placenta en combinación con queratinocitos de mamífero y su uso como agente de regeneración tisular de piel, el cual consiste en un proceso para la generación de un injerto de piel artificial en laboratorio utilizando técnicas especializadas en biotecnología como es el cultivo de células de mamífero, preferentemente humanas, en el cual se cultivan en condiciones asépticas los queratinocitos que forman parte de la capa epidérmica de la piel, los cuales se combinan con una malla rica en colágeno la cual se obtiene a partir de células que componen la estructura de la piel en combinación con membrana amniótica de placenta para generar dos capas que puede utilizarse en pacientes quemados o con lesiones en la piel; adicionalmente esta tecnología reduce considerablemente el costo del tratamiento comparado con el costo de los métodos actuales como los tratamientos de injertos de piel (autoinjertos o aloinjertos) y el resultado de este proceso es una pronta reorganización celular, remodelación y re-epitelización de la herida originando la formación de nuevo tejido cutáneo y evitando la formación de tejido fibrótico resultado de la contracción muscular.