

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Despacho

Re.: Expediente No. NC2016/0000433

Solicitud de Patente de Invención titulada:

**“PROCESO DE OBTENCION DE UN COMPUESTO DE
ASPERSION CELULAR DE FIBROBLASTOS Y
QUERATINOCITOS HUMANOS EN SOLUCION PARA
REGENERAR LESIONES CUTÁNEAS”.**

Solicitante: EDUARDO ALVARO GALUE

RESPUESTA AL OFICIO No. 12197 DE 2017

MARIBEL HERNANDEZ QUINTERO, identificada con la cédula de ciudadanía número 52.195951 de Bogotá y Tarjeta Profesional número 106.991 del C. S. de la J., en mi calidad de apoderada del señor EDUARDO ALVARO GAULE, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 45 de la Decisión 486 de 2000 de la Comunidad Andina, en los siguientes términos:

1. Reivindicaciones relativas a un uso

Se reescribió la Reivindicación 13 (nueva reivindicación 10), la cual hacía referencia a un uso de la invención de acuerdo a las sugerencias del Examinador.

2. Título

Atendiendo la sugerencia del Examinador, me permito modificar el título de la presente solicitud como sigue:

**“PROCESO DE OBTENCION DE UN COMPUESTO DE
ASPERSION CELULAR DE FIBROBLASTOS Y**

QUERATINOCITOS HUMANOS EN SOLUCION PARA REGENERAR LESIONES CUTÁNEAS"

3. Modificación a las Reivindicaciones

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de 10 reivindicaciones y reemplaza completamente el capítulo presentado anteriormente. En el nuevo capítulo reivindicatorio se realizaron las siguientes modificaciones:

3.1 En la antigua reivindicación 1, se incorporan las características de la antigua reivindicación 2 "en donde 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 estreptomicina/penicilina; después, lava al menos 3 veces con una solución de PBS 1X conteniendo 1% v/v de estreptomicina/penicilina; después del lavado de la muestra de piel, se incuba con 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", para darle claridad a la invención.

3.2 En la antigua reivindicación 2 (nueva reivindicación 1), se incorporan las características de las antiguas reivindicaciones 4 y 5 en donde la solución antibiótica/antimicótico es "estreptomicina/penicilina" y en donde la enzima es "Dispasa", para darle claridad y concisión a la invención de acuerdo a las sugerencias del Examinador.

3.3 Se elimino la expresión "preferentemente" del capítulo reivindicatorio para darle claridad a la invención.

3.4 En la antigua reivindicación 7 (nueva reivindicación 4) se eliminó la expresión "por un periodo de" la cual era confusa y para así dar claridad a la materia reclamada.

3.5 En la antigua reivindicación 8 (nueva reivindicación 5) se reemplazó la unidad del tamaño de poro de "40 pm" por "40 µm" de acuerdo a las sugerencias del Examinador.

3.6 En la antigua reivindicación 9 (nueva reivindicación 6) se reemplazó el porcentaje de una confluencia del "0%" por "100%" de acuerdo a las sugerencias del Examinador.

3.7 En las antiguas reivindicaciones 10 y 11 (nuevas reivindicaciones 7 y 8) se reemplazó la unidad "ce" por "cc" para dar claridad a la invención.

3.8 En la antigua reivindicación 11 (nueva reivindicación 8) se reemplazó la expresión "aspersor fibrijet" por "dispositivo de aspersión celular" y así dar claridad a la invención.

3.9 Se eliminaron las antiguas reivindicaciones 4 y 5 del capítulo reivindicatorio.

3.10 En el capítulo reivindicatorio se corrige el error tipográfico "reticulatne" por "reticulante" de acuerdo a las sugerencias del Examinador.

3.11 Se reenumero el capítulo reivindicatorio y sus dependencias, de acuerdo a las modificaciones anteriores.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud y se realizaron con el ánimo de superar las objeciones de claridad y nivel inventivo planteadas por el examinador en su concepto técnico.

4. Pago de tasas

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta tasa por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene un número menor de cláusulas que el originalmente presentado y es en

esencia el mismo objeto, pero más limitado y definido con mayor claridad.

5. Claridad de la solicitud

5.1 Reivindicaciones (Art. 30)

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, siguiendo las recomendaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico.

En relación con la antigua reivindicación¹¹ (nueva reivindicación 8) que hace referencia a un aspersor fibrijet, es deseo del solicitante manifestar que el dispositivo de aspersión celular se utiliza para la entrega simultánea de dos productos biológicos no-homogéneos que comprenden fluidos, suspensiones y soluciones celulares los cuales reaccionan entre sí al entrar en contacto en el aire para su utilización como un compuesto regenerativo tisular, aplicado sobre un sitio de lesión de tejido dérmico y/o epidérmico causado por alguna lesión.

El dispositivo consiste en dos cartuchos estériles desechables tipo jeringa de 10 cc a 50 cc cada uno con su émbolo movable y adaptador hermético para la dispensación de los fluidos, ensamblados sobre un sistema de sujeción tipo pistola con punta para aspersión cónica, y acoplado a una unidad reguladora de presión de aire a través de un filtro estéril de aire.

La unidad reguladora de presión de aire es adaptable a compresores de aire y cuenta con salida dual hacia el dispositivo para empleo tanto en la línea de aspersión como en la línea de empuje de cartuchos. La salida de aire a la línea de aspersión a 15-50 PSI que se acciona mediante un pedal mecánico. La línea de empuje de cartuchos está caracterizada por poseer un circuito neumático interno que permite el paso de aire por medio de una válvula que es accionada por medio de gatillo, el cual comprime un resorte de 6 mm de carrera permitiendo el paso de aire desde el regulador hacia los cartuchos a la presión deseada.

El sistema de sujeción permite la adaptación de cartuchos de diferentes calibres y con distintas capacidades volumétricas, y cuenta con un mango ergonómico que encierra las conexiones del circuito neumático actuador, permitiendo la viabilidad celular de las líneas celulares implantadas junto con su biomaterial de implantación.

En consecuencia, nos permitimos indicar que el presente capítulo reivindicatorio, que incluye 10 reivindicaciones, se ajusta a las disposiciones del artículo 30 de la Decisión 486/00.

6. Nivel inventivo

El examinador establece en su concepto técnico la falta de nivel inventivo de las antiguas reivindicaciones 1 y 13 (nuevas reivindicaciones 1 y 10) a la luz de las enseñanzas técnicas descritas en el documento ES 2377962T (D1).

A este respecto, me permito indicar que el artículo 18 de la Decisión 486 establece que *"Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica"*.

Se resalta entonces que lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo NO es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo debe demostrar la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace necesario demostrar que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Considerando la anterior definición, es deseo del solicitante señalar que las enseñanzas de D1 no hace obvia la presente invención.

De forma específica, es importante tener en cuenta el hecho que la reivindicación independiente 1 define:

"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 en 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 reticulante de reacción de la solución de aspersión celular, y*
- g) preparación de la solución de aspersión celular, en donde 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 estreptomicina/penicilina; después, lava al menos 3 veces con una solución de PBS 1X conteniendo 1% v/v de estreptomicina/penicilina; después del lavado de la muestra de piel, se incuba con 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"*

En este sentido, nos permitimos informar respetuosamente nuestro desacuerdo. El documento D1 citado por el Examinador **no aportan la motivación necesaria para conseguir nuestra invención,** tampoco proporciona o **cita específicamente cada una de las características técnicas esenciales actualmente reclamadas** en la presente invención y tampoco revela o enseña las etapas de **"preparación de la solución del agente reticulante de reacción de la solución de aspersión celular, y preparación de la solución de aspersión celular, en donde 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 estreptomicina/penicilina; después,**

lava al menos 3 veces con una solución de PBS 1X conteniendo 1% v/v de estreptomicina/penicilina; después del lavado de la muestra de piel, se incuba con 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", como se encuentra definido en la nueva reivindicación independiente 1. En vista de lo anterior, se demuestra que una persona experta en la materia no podría y no habría llegado a la presente invención en vista de la anterioridad citada como D1.

En este sentido, nos permitimos informar que el documento D1 simplemente se limita a describir una composición de regeneración tisular formada por dos componentes: un primer componente que comprende fibrinógeno (que es la solución de suero acelular plasmático empleada en la solución de aspersión celular de la presente solicitud), y un segundo componente formado por trombina más fibroblastos y queratinocitos; ambos componentes se aplican mediante pulverización al sitio de la herida. En los ejemplos 1 y 2 del documento D1 se indica el procedimiento de obtención de queratinocitos y fibroblastos a partir de muestras de piel, y la composición de los componentes 1 y 2 de la mencionada composición de regeneración tisular. Sin embargo, no se detallan las etapas del proceso con tanta profundidad como en la solicitud, y no se describen las condiciones concretas de cada paso que son reivindicadas en la solicitud: por ejemplo, la concentración exacta de la enzima de disgregación celular, los lavados, el tratamiento con estreptomicina/penicilina de la muestra de piel, o los procesos de obtención de queratinocitos y fibroblastos a partir de la epidermis y la dermis ya separadas; además, los dos componentes empleados en D1 son diferentes a las soluciones de agente reticulante y de aspersión celular de la solicitud, pues en D1 se describe, por un lado, la solución de fibrinógeno, y, por otro las células con la trombina, mientras que en la solicitud, la trombina se prepara por separado, y las células se suspenden en el suero celular plasmático (equivalente al fibrinógeno de D1). Por tanto, no se considera que la información descrita en el documento D1 afecte la novedad, ni el nivel inventivo de las reivindicaciones 1 a 10 de la presente solicitud.

Ahora bien, el solicitante desea hacer énfasis en el hecho que el proceso de la presente solicitud se basa en diferentes aspectos técnicos frente al arte previo citado como D1, a continuación, se describe que:

1.- Origen del tejido:

En el documento D1 el aislamiento celular de los fibroblastos y queratinocitos humanos se basa a partir de prepucio de recién nacido. Esto conlleva que solamente el proceso está basado en tejido alogénico o de donación.

En la presente solicitud el aislamiento celular de los fibroblastos y queratinocitos humanos se basa a partir de una lámina de piel obtenida por un instrumento quirúrgico denominado dermatoma, la cual el tejido puede ser autólogo (del propio paciente) o alogénico (de donación). Esto con lleva abrir más el horizonte para la reparación tisular en diversos pacientes.

2.- Diferencias en la Expansión celular in vitro y estado de las células:

En el documento D1 la expansión in vitro de los fibroblastos y queratinocitos están basados principalmente en la suplementación del medio de cultivo con Suero Bovino Fetal. Para posteriormente se inactivadas mitóticamente por inhibidores o agentes químicos o agentes físicos para su post pulverización.

En la presente solicitud, la expansión in vitro de los fibroblastos y queratinocitos están basados principalmente en la suplementación del medio de cultivo con Plasma humano autólogo del paciente que será tratado. Esto garantiza la disminución del rechazo inmunológico en su post implantación y la fabricación de un tratamiento personalizado si es tejido cutáneo del paciente a tratar. Sumado a esto, las células pulverizadas se localizan en su estado puro y natural biológico sin manipulación genética o de su estructura celular.

3.- Diferencias en el Compuesto 1:

En el documento D1, el compuesto 1 de pulverización comprende de fibrina humana la cual proviene de un producto comercial denominado Tisseel o Tissucol de la compañía farmacéutica Baxter, donde se sintetiza en dicho producto comercial la proteína denominada Fibrina que sirve como pegamento para heridas a partir de tejido sanguíneo de donadores por lo que puede conllevar el riesgo de transmitir agentes infecciosos como virus y en teoría, el agente de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD). Por tal motivo, el compuesto 1 comprende un único componente que comprende solamente la molécula de fibrina humana a partir de un producto comercial de la compañía Baxter.

En la presente solicitud el compuesto 1 de pulverización está basado en la combinación de plasma rico en plaquetas obtenida de a partir de la separación del tejido sanguíneo del paciente a tratar y de un crio preservado de plaquetas de un banco de Sangre con ambas líneas celulares el cual contiene la molécula de fibrina humana como biomaterial de implantación. La fibrina humana obtenida del paciente a tratar representa grandes ventajas del proceso debido a que proporciona un suministro de factores de crecimiento derivados de plaquetas humanas en su estado natural como son: (PDGF), (VEGF), (EGF), (KGF), (FGF), (BMPs), (G-CSF), (GM-CSF), (HGF), (IGF), (TPO), (TCGF), que potencializa la regeneración de la herida y propicia un micro y macro ambiente más idóneo para las células implantadas y sobre todo ayuda a disminuir o eliminar el rechazo inmunológico de las células implantadas en el caso de ambas líneas celulares provengan de tejido de donación. Por tal motivo, el compuesto 1 de la solicitud actual comprende un primer componente que comprende plasma rico en plaquetas autólogo o alogénico, un segundo componente que comprende fibrina humana y un tercer componente que comprende queratinocitos y fibroblastos autólogos o alogénicos.

4.- Diferencias en el Compuesto 2:

En el documento D1, el compuesto 2 de pulverización comprende un segundo componente que comprende trombina humana a partir de un producto comercial denominado Tisseel o Tissucol de la compañía

farmacéutica Baxter, donde se sintetiza en dicho producto comercial la proteína denominada trombina que sirve como pegamento para heridas a partir de tejido sanguíneo de donadores, y un segundo componente que comprende los fibroblastos y queratinocitos alogénicos inactivados mitóticamente por inhibidores o agentes químicos o físicos.

En la presente solicitud el compuesto 2 de pulverización comprende de trombina bovina de pulmón en cloruro de sodio al 0.9% y/o de Cloruro de Calcio al 1%. Esto garantizará obtener una vía más rápida y práctica para el proceso de pulverización ya que puede realizarse con simple cloruro de calcio.

5.- Dispositivo de aspersión:

En el documento D1, el dispositivo de aspersión está basado en la utilización del dispositivo de producto Tisseel o Tissucol de la compañía farmacéutica Baxter.

En la presenta solicitud de patente se utiliza nuestro propio dispositivo médico desarrollado in house, con presiones diferentes de aspersión para garantizar el tamaño micro celular de las gotas implantadas garantizando una mejor viabilidad celular que beneficiará la regeneración de la herida. El dispositivo de aspersión celular se utiliza para la entrega simultánea de dos productos biológicos no-homogéneos que comprenden fluidos, suspensiones y soluciones celulares los cuales reacción entre si al entrar en contacto en el aire para su utilización como un compuesto regenerativo tisular, aplicado sobre un sitio de lesión de tejido dérmico y/o epidérmico causado por alguna lesión.

El dispositivo consiste en dos cartuchos estériles desechables tipo jeringa de 10 cc a 50 cc cada uno con su émbolo movable y adaptador hermético para la dispensión de los fluidos, ensamblados sobre un sistema de sujeción tipo pistola con punta para aspersión cónica, y acoplado a una unidad reguladora de presión de aire a través de un filtro estéril de aire.

La unidad reguladora de presión de aire es adaptable a compresores de aire y cuenta con salida dual hacia el dispositivo para empleo tanto

en la línea de aspersión como en la línea de empuje de cartuchos. La salida de aire a la línea de aspersión a 15-50 PSI que se acciona mediante un pedal mecánico. La línea de empuje de cartuchos está caracterizada por poseer un circuito neumático interno que permite el paso de aire por medio de una válvula que es accionada por medio de gatillo, el cual comprime un resorte de 6 mm de carrera permitiendo el paso de aire desde el regulador hacia los cartuchos a la presión deseada.

El sistema de sujeción permite la adaptación de cartuchos de diferentes calibres y con distintas capacidades volumétricas, y cuenta con un mango ergonómico que encierra las conexiones del circuito neumático actuador, permitiendo la viabilidad celular de las líneas celulares implantadas junto con su biomaterial de implantación.

6.- Fundamento del proceso en la reparación tisular de la piel:

En el documento D1 la reparación tisular está basada principalmente en la pulverización de fibroblastos y queratinocitos humanos que en la implantación sobre la herida se pretende que secreten factores angiogénicos u otros de crecimiento por su previa inactivación mitótica; lo cual dichos factores impulsarán la reparación tisular. Prácticamente, el documento D1 está basado en la implantación de factores de crecimiento que estarán secretando las células por su inactivación mitótica sobre la herida. Con esto, se pretende que estimule el cuerpo una pronta regeneración o reparación tisular.

En contraste, en la presente solicitud la reparación tisular está basada en la utilización de fibroblastos y queratinocitos en su estado puro y natural biológico las cuales dichas células son capaces de re-organizarse, comunicarse entre para la estimulación de nuevo tejido cutáneo. Sumado a esto, los factores de crecimiento que beneficiarán el macro y micro ambiente celular que re-organizará las células implantadas (biomaterial) está incluido en la solución del compuesto 1 a partir de la obtención de plasma rico en plaquetas del paciente a tratar o de un crio preservado de plaquetas de banco de sangre en qué conjunto no solo se utiliza el proceso celular de ambas líneas celulares en la generación de nuevo tejido cutáneo sino además se está implantando ciertas moléculas denominadas factores de crecimiento derivados de plaquetas humanas del propio paciente que

recibirá la implantación las cuales son: (PDGF), (VEGF), (EGF), (KGF), (FGF), (BMPs), (G-CSF), (GM-CSF), (HGF), (IGF), (TPO), (TCGF), que potencializa la regeneración de la herida y propicia un micro y macro ambiente más idóneo para las células implantadas y sobre todo ayuda a disminuir o eliminar el rechazo inmunológico de las células implantadas en el caso de que vengan de piel de donación para un tratamiento. A su vez, presenta otras propiedades que benefician el nivel terapéutico del proceso como son: evita la pérdida de humedad de la herida, modela el proceso inflamatorio, actúa como modulador del dolor y sobre todo propicia que las células sobrevivan más en el tejido sanguíneo puro.

En este sentido, y según lo reconocido por el examinador D1, no divulga ni enseña las etapas del proceso de **preparación de la solución del agente reticulante de reacción de la solución de aspersión celular, y preparación de la solución de aspersión celular, en donde 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 estreptomicina/penicilina; después, lava al menos 3 veces con una solución de PBS 1X conteniendo 1% v/v de estreptomicina/penicilina; después del lavado de la muestra de piel, se incuba con 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.** Por lo tanto, basado solo en D1, no hay nada que pueda indicar que la persona experta pueda obtener un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos a partir de un proceso que comprenda las etapas de: a) separación de la dermis y epidermis, b) incubación en 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 reticulante de reacción de la solución de aspersión celular, y g) preparación de la solución de aspersión celular, en donde 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 estreptomicina/penicilina; después, lava al menos 3 veces con una solución de PBS 1X conteniendo 1% v/v de estreptomicina/penicilina; después del lavado de la muestra de piel, se incuba con 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 colocan dichas capas en contenedores estériles e independientes, como lo hace la presente invención.

De acuerdo con esto, no solo no sería obvio para el experto usar los pasos descritos anteriormente que comprenden la concentración exacta de la enzima de disgregación celular, los lavados, el tratamiento con estreptomicina/penicilina de la muestra de piel, o los procesos de obtención de queratinocitos y fibroblastos a partir de la epidermis y la dermis ya separadas; la preparación de la solución del agente reticulante de reacción de la solución de aspersion celular, y la preparación de la solución de aspersion celular, en donde 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..., al haber leído D1, en vista de lo anterior, tampoco habría tenido la motivación para considerar un documento que revela cada una de las etapas del proceso al haber leído D1, y mucho menos con tan solo las enseñanzas de dicho documento D1 de tal forma que resulte en la presente invención.

Presentamos que la invención reivindicada aborda un problema previamente no identificado, de una manera no contemplada por el estado de la técnica.

Por lo tanto, a la vista de la técnica anterior citada, se requiere de un nivel inventivo para llegar a la materia objeto de la reivindicación 1 y todas las reivindicaciones dependientes de la misma.

Así las cosas, un experto en la materia puede ver que la reivindicación 1, que define *un proceso de obtención de un compuesto de aspersion celular de fibroblastos y queratinocitos*

caracterizado porque se comprende de las siguientes etapas: a) separación de la dermis y epidermis, b) incubación en 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 reticulante de reacción de la solución de aspersión celular, y g) preparación de la solución de aspersión celular, en donde 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 estreptomicina/penicilina; después, lava al menos 3 veces con una solución de PBS 1X conteniendo 1% v/v de estreptomicina/penicilina; después del lavado de la muestra de piel, se incuba con 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, es novedosa en vista de la anterioridad D1.

Además, la reivindicación independiente 1 incluye elementos y limitaciones novedosas en vista de D1, por lo que dicha cláusula independiente también es inventiva en vista del mencionado documento. Dado que las reivindicaciones 2 a 10 dependen directa o indirectamente de dicha cláusula independiente, éstas también cumplen con los requisitos de patentabilidad.

De acuerdo con lo definido en los párrafos anteriores, queda claro que las enseñanzas del documento D1 no llevaría a obtener la presente invención como se encuentra definida en la reivindicación independiente 1, ya que dichas divulgaciones son insuficientes y la única forma de llegar a la presente invención es por medio de un análisis de tipo retrospectivo o "hindsight", el cual es totalmente inaceptable y no se puede aplicar.

De esta forma, se demuestra que las reivindicaciones 1 a 10 cumplen con el requisito de novedad y nivel inventivo según los lineamientos de los artículos 16 y 18 de la Decisión 486/00.

Adicional a lo anterior, es deseo del solicitante indicar que la solicitud equivalente en México ha sido recientemente concedida por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (IMPI) bajo el título de patente No. 342233. Específicamente, el examinador de dicha oficina ha considerado que la presente reivindicación 1 como novedosa y no obvia sobre la técnica anterior. Se presenta como anexo al presente memorial copia de la Patente Mexicana No. 342233.

Sobre el tema de la actividad inventiva, es de bien saber que para llegar a las condiciones óptimas en las que se desarrolla la presente invención, se realizó un proceso metodológico basado en el método científico, considerando que una persona del oficio normalmente versada en la materia no podría concluir las mismas especificaciones y condiciones para llevar a cabo la presente invención, toda vez que este procedimiento no es un procedimiento habitual en tratamientos de personas con quemaduras o lesiones cutáneas en ninguna parte del mundo, a pesar que la misma utilice reactivos y materiales que están cotidianamente en laboratorios o centros de investigación dedicados a cultivo celular o a regeneración tisular; por lo que el presente método puede considerarse con un alto nivel inventivo. De la misma forma en la solicitud del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes, número PCT/MX2015/000001, se considera en la OPINIÓN ESCRITA DE LA ADMINISTRACIÓN ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL, considera que las reivindicaciones 2 a 12 poseen tanto novedad como actividad inventiva.

De esta forma, aunque el solicitante reconoce la independencia de las Oficinas de Patentes, resulta sorprendente que otras Oficinas hayan reconocido todos los requisitos de patentabilidad para la invención reclamada, mientras únicamente la Oficina de Patentes en Colombia difiere de tal opinión, siendo la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial conceptos universales.

7. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) La presente solicitud es clara, concisa y está debidamente soportada en la descripción, cumpliendo con los requerimientos del Artículo 30 de la Decisión 486; y
- ii) Las reivindicaciones actuales son patentables sobre D1, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 16 y 18 de la Decisión 486.

En consecuencia, se solicita atentamente otorgar el privilegio de patente solicitado, toda vez que esta solicitud cumple con los requerimientos de la Decisión 486.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el señor Examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 - el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo- y 42 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo que señala que: "*Habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión, que será motivada. La decisión resolverá todas las peticiones que hayan sido oportunamente planteadas dentro de la actuación por el petitionario y por los terceros reconocidos*", (el subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

8. Anexos

8.1 Nuevo capítulo reivindicatorio que incluye 10 reivindicaciones.

8.2 Copia de Patente Mexicana No. 342233.

Señor Director,



MARIBEL HERNANDEZ QUINTERO
C.C. No. 52.195.951 de Bogotá
T.P. 106.991 del C. S. de la J.

REIVINDICACIONES

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 en 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 reticulante de reacción de la solución de aspersión celular, y
 - g) preparación de la solución de aspersión celular, en donde 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 estreptomicina/penicilina; después, lava al menos 3 veces con una solución de PBS 1X conteniendo 1% v/v de estreptomicina/penicilina; después del lavado de la muestra de piel, se incuba con 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.
- 2) El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la lámina de piel es preferentemente de 0.015 pulgadas.
- 3) 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 separa 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.
- 4) 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 para obtener fibroblastos en monocapa.

5) 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 40 μm para obtener los queratinocitos humanos en suspensión en el producto filtrado.

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 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.

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 f), se genera en condiciones asépticas 15ml de trombina bovina de pulmón al 27% v/v a una concentración de U/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.

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 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 dispositivo de aspersión celular para obtener un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos.

9) El proceso de obtención de un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque la sangre periférica autóloga

es preferentemente plaquetas humanas o crio preservado de plaquetas.

10) Un medicamento cicatrizante que comprende un compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

TÍTULO DE PATENTE NO. 342233

Titular(es): EDUARDO ALVARO GALUE

Domicilio: Av. Carlos Canseco S/N Esq. con Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro, 64460, Monterrey, Nuevo León, MÉXICO

Denominación: PROCESO DE OBTENCIÓN DE UN COMPUESTO DE ASPERSIÓN CELULAR DE FIBROBLASTOS Y QUERATINOCITOS HUMANOS EN SOLUCIÓN Y SU USO COMO AGENTE REGENERATIVO DE LESIONES CUTÁNEAS.

Clasificación: Int.Cl.8: A61F2/10; A61L27/60

Inventor(es): EDUARDO ALVARO GALUE

SOLICITUD

Número:
MX/a/2014/001356

Fecha de presentación:
4 de febrero de 2014

Hora:
11:39

PRIORIDAD

País:

Fecha:

Número:

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 4 de febrero de 2034

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente ~~tiene una vigencia de~~ veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y ~~estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.~~

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 03/03/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 24 de agosto de 2016

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES



NAHANNY CANAL REYES



**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 movers en los 3 ejes dimensional s) 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

transplante 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 transplante 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

embriónes 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 INVENCIÓN

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::

a) Separación de la dermis y la epidermis.

- 10 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 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
- 15 PBS 1X conteniendo 1% v/v de antibiótico/antimicótico. Preferentemente, la solución de antibiótico/antimicótico es estreptomina/penicilina. Después del lavado de la muestra de piel, incubar con una enzima proteolítica de disgregación celular, preferentemente dispasa, a una concentración de 1.79 unidades/mg en condiciones de temperatura de 4°C por al menos 16 horas
- 20 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 epidérmica para obtener una epidermis tripsinizada.

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 20 minutos a una temperatura de 37 °C para obtener una epidermis tripsinizada.

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 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.

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 $40\mu\text{m}$ para obtener los queratinocitos humanos en suspensión en el producto filtrado.

e) Proliferación de los queratinocitos en suspensión.

- 5 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% CO_2 y 20% O_2 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
10 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%
15 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

- 20 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.

5

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

- 10 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
- 15 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
- 20 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 queratinocitos humanos se puede obtener utilizando el producto de fibrinógeno de donador humano mediante el producto denominado "Tissucol" de laboratorios Baxter.

- 5 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.

10

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
- 15 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.

20 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.

5 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

5 exposición a infecciones.

El compuesto de aspersion celular de fibroblastos y queratinocitos humanos

que 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

10 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.

15

20

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 compuesto de aspersion celular de fibroblastos y queratinocitos que se comprende de las etapas de: a) Separación de la dermis y epidermis, b) incubación de la capa de epidermis para obtener una epidermis tripsinizada, c) disgregación de la
10 capa de dermis y proliferación de fibroblastos, d) disgregación de la capa de epidermis, e) proliferación de los queratinocitos en suspesión, f) preparación de la solución del agente reticulante de reacción de la solución de aspersion celular, y g) preparación de la solución de aspersion celular **caracterizado porque** la etapa a) se lleva a cabo a
15 partir de una muestra de piel previamente obtenida de un paciente por medio de un dermatoma en condiciones estériles; 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
20 conteniendo 1% v/v de antibiótico/antimicótico; después del lavado de la muestra de piel, se incuba con una enzima proteólica 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.

2. El proceso de obtención de un compuesto de aspersion celular de
5 fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la
reivindicación 1, **caracterizado porque** la lámina de piel es
preferentemente de 0.015 pulgadas.
- 10 3. El proceso de obtención de un compuesto de aspersion celular de
fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la
reivindicación 1, **caracterizado porque** la solución
antibiótico/antimicótico es preferentemente estreptomycin/penicilina.
- 15 4. El proceso de obtención de un compuesto de aspersion celular de
fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la
reivindicación 1, **caracterizado porque** la enzima es preferentemente
dispasa.
- 20 5. El proceso de obtención de un compuesto de aspersion celular de
fibroblastos y queratinocitos humanos, de conformidad con la
reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa b) se separa 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
25 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.

- 5 6. El proceso de obtención de un compuesto de aspersion 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
- 10 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.
- 15 7. El proceso de obtención de un compuesto de aspersion 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
- 20 humanos conteniendo Suero bovino fetal al 10% y se agita 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.

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 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.
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 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.
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 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 x 10⁶ fibroblastos en monocapa y 10 x 10⁶ 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.

5

11.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.

10

12. Uso del compuesto de aspersión celular de fibroblastos y queratinocitos humanos obtenido en el proceso descrito en las reivindicaciones 1 a 11 para preparar un medicamento útil en la regeneración de lesiones cutáneas.

15

20

25

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 epidermis, incubación de la capa epidermis, disgregación de la capa de dermis y proliferación de fibroblastos, disgregación de la capa de epidermis, proliferación de 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.