

## 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 reivindicaciones:

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; en donde la obtención de una membrana amniótica ocurre mediante la separación de dicha membrana del corión de la placenta de mamífero y posteriores lavados con soluciones amortiguadoras de fosfatos conteniendo soluciones de antibióticos/antimicóticos; y en donde la descelularización de las membranas amnióticas comprende la incubación en componentes tensioactivos aniónicos disueltos en soluciones amortiguadoras de fosfatos, posteriores lavados con soluciones amortiguadoras de fosfatos y la resuspensión de las membranas amnióticas en un agente crioprotector con medio de cultivo celular, soluciones amortiguadoras y una solución de antibiótico-antimicótico;

b) Obtener queratinocitos alogénicos a partir de prepucio neonatal o queratinocitos autólogos a partir de una muestra del paciente; en donde la obtención de queratinocitos alogénicos comprende lavados del tejido con soluciones amortiguadoras de fosfatos con soluciones de antibióticos/antimicóticos a diferentes concentraciones;

c) Proliferación *in vitro* de los queratinocitos en suspensión; en donde los queratinocitos son sembrados en suspensión en un medio de cultivo celular revestido con colágeno tipo 1; y

d) Preparación del sustituto dérmico funcional; en donde el sustituto dérmico funcional es preparado mediante lavados de la membrana amniótica descelularizada con soluciones amortiguadoras de fosfatos conteniendo soluciones de antibióticos/antimicóticos, una posterior disposición de la membrana en una caja

de cultivo celular sobre la cual se siembra el pellet celular de los queratinocitos y una incubación por un periodo de dos semanas para la generación de la estratificación de la epidermis sobre la superficie de la membrana amniótica descelularizada.

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 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.

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% (p/v) disuelta en una solución amortiguadora 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 amortiguadora 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 amortiguadora 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 amortiguadora 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 incubar en una solución de Dodecilsulfato sódico (SDS) a una concentración de 0,03 % - 0,050% (p/v) disuelta en una solución amortiguadora 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 amortiguadora 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 amortiguadora 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 dermis que al cabo de 16 horas son separadas mecánicamente y dispuestas 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 incuba a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% CO<sub>2</sub> y 20% O<sub>2</sub> por un periodo de al menos dos semanas para obtener una cantidad de 10 a 50 x 10<sup>6</sup> 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 (CaCl<sub>2</sub>) 0.15-0.2 mM; incubar a 37 °C, 95% de humedad relativa, 5% CO<sub>2</sub> y 20% O<sub>2</sub> por un periodo de al menos dos semanas para obtener una cantidad de 10-50 x 10<sup>6</sup> 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 amortiguadora 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.

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% CO<sub>2</sub> y 20% O<sub>2</sub> 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 (CaCl<sub>2</sub>) 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.