

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 768**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61F 2/10 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2015 E 15305441 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 3072535**

54 Título: **Método de reconstrucción de piel**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (33.3%)
35 Place Pey Berland
33000 Bordeaux, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%) y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE
BORDEAUX (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CASOLI, VINCENT;
CARIO-ANDRÉ, MURIEL y
LEPIVERT, JEAN-CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

POINDRON, Cyrille

ES 2 625 768 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de reconstrucción de piel

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de preparación de un sustituto de piel, a un sustituto de piel animal, preferentemente de mamífero y/o de ser humano, que puede obtenerse realizando el método y a un kit para la realización del método.

10 La presente invención también se refiere a un injerto constituido por un sustituto de piel y su utilización como medio de tratamiento de un trastorno cutáneo y/o de una pérdida de sustancia cutánea.

15 La presente invención encuentra una aplicación en particular en los campos farmacológico, médico, clínico.

En la descripción que sigue a continuación, las referencias entre corchetes ([]) envían de nuevo a la lista de referencias presentadas al final del texto.

20 Estado de la técnica

La piel es un órgano muy complejo que comprende una estructura estratificada muy particular. Esta comprende tres partes principales:

- 25 - una parte superficial, la más fina, denominada epidermis,
- una parte interna más gruesa, la dermis, a la que se une la epidermis, y
- una capa más profunda, la hipodermis.

30 En particular asegura una barrera entre los medios externos y el medio interno de numerosos mamíferos, entre los cuales en particular el ser humano. Debido a esta función de « barrera », la piel asegura de manera natural la protección del organismo al tiempo que asegura una comunicación entre el mismo y el entorno externo. La piel constituye el primer órgano de defensa con respecto a cualquier agresión.

35 Las agresiones sufridas por la piel son múltiples, por ejemplo se puede tratar de agresiones relacionadas con U.V. susceptibles de comportar reacciones inflamatorias/alteraciones celulares que son el origen de cánceres, agresiones físicas tales como quemaduras, escarificaciones, por ejemplo debidas a objetos cortantes, agresiones químicas, por ejemplo relacionadas con productos químicos, tales como detergentes. Estas diferentes agresiones pueden inducir en particular trastornos cutáneos susceptibles de modificar la estructura de la piel, de alterar su coloración y/o de provocar la aparición de heridas cutáneas.

40 De hecho se sabe que los productos químicos y/o moléculas tales como la hidroquinona, cuando se usan a dosis elevadas puede inducir una fuerte despigmentación, provocar cicatrices, estrías, patologías graves, por ejemplo, diabetes, hipertensión, cánceres de piel o complicaciones sistémicas, trastornos renales, un desarrollo de pilosidad y producir barba y una alteración del olor corporal. Cuando la decoloración va más allá del efecto deseado estas consecuencias pueden ser irreversibles. La solución principal sigue siendo entonces el injerto de piel para tratar de « encontrar » un aspecto normal.

50 Otros elementos pueden estar en el origen de una alteración de la piel, por ejemplo de los parámetros de orden genético y/o relacionados con trastornos endocrinos y/o autoinmunes sistémicos. En particular se puede tratar de patologías que provocan un trastorno pigmentario tal como vitíligo, hipermelanosis, hipomelanosis o un nevus. Uno de los métodos de tratamiento de los trastornos de este tipo incluye injerto de piel y/o implante de células de pigmentarias. Sin embargo, estos métodos presentan eficacias relativas o relacionadas a menudo con la estabilidad de las pieles y/o células pigmentarias aplicadas.

55 La piel también se puede lesionar, por ejemplo, mediante factores externos tales como objetos cortantes, que provocan heridas más o menos profundas. La piel presenta capacidades de regeneración y de cicatrización muy significativas que permiten, la mayoría de las veces, una cicatrización a mayor o menor plazo. El tiempo y/o la capacidad de cicatrización dependerán en particular de la profundidad/extensión de la herida y también del estado fisiológico del individuo. De hecho, en el caso de heridas profundas, estas pueden representar « puertas abiertas » para los patógenos que requieren una mayor vigilancia y/o la necesidad de cirugía para cerrar la herida, por ejemplo, con puntos de sutura o aplicando en la misma un injerto de piel para permitir en particular que la piel se regenere, en particular para reparar diferentes partes lesionadas.

65 En el estado de la técnica existen sustitutos de dermis artificiales que en particular permiten de manera temporal la formación de un entorno favorable para la regeneración de la piel. La estructura y el entorno constituidos por estos sustitutos a menudo son similares a los de la dermis. Sin embargo, estos sustitutos son dispositivos médicos, esencialmente sintéticos y de coste elevado.

En el estado de la técnica también existen sistemas de cultivos celulares, en particular queratinocitos, obtenidos a partir de una muestra de piel de un individuo que después de varias semanas forma de un cultivo que se puede depositar/vaporizar sobre una herida, por ejemplo, una herida crónica o una quemadura para favorecer su cicatrización.

La patente de Estados Unidos N.º 5 755 814 describe por ejemplo un método para preparar un modelo de piel que comprende la provisión de una matriz tridimensional de colágeno reticulado, la siembra de la matriz con fibroblastos y cultivo de dicha matriz sembrada, la siembra de la superficie de la matriz con las células epidérmicas, una primera etapa de cultivo en condiciones que permitan la unión de las células epidérmicas y su proliferación con el fin de formar una capa, y una segunda etapa de cultivo.

Sin embargo, estos métodos y alternativas no se constituyen como sustitutos de piel que comprenden las células mayoría que componen la piel, tales como fibroblastos, queratinocitos y melanocitos. En particular, estos sustitutos no comprenden melanocitos y por lo tanto no permiten obtener sustitutos de piel pigmentados y/o susceptibles de ser pigmentados. Por otra parte, estas alternativas no se pueden utilizar por ejemplo para el tratamiento de trastornos pigmentarios, el tratamiento de heridas profundas, por ejemplo, debidas a intervenciones quirúrgicas, accidentes que provoquen por ejemplo una pérdida significativa de la piel que puede ir hasta la pérdida total de la piel.

Además, los métodos de obtención de los sustitutos de dermis disponibles son métodos « lentos » que no permitir, por ejemplo, la obtención de sustitutos en plazos compatibles para el tratamiento de heridas específicas tales como quemaduras profundas.

Por último, la mayoría de los sustitutos de la piel disponibles en el mercado son productos frágiles tanto a nivel estructural como epidemiológico. Además, estos productos a menudo son de pequeño tamaño, en particular para evitar un posible desgarramiento del producto durante su manipulación.

Por lo tanto, existe una necesidad real de encontrar un método de preparación de un sustituto de piel para superar estas deficiencias, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior, en particular un método que permita obtener un sustituto de piel que comprende las células mayoría que componen de la piel, en particular fibroblastos, queratinocitos y melanocitos, para reducir los costes y el tiempo de preparación del sustituto.

También existe una necesidad real en el estado de la técnica de encontrar un método que permita la producción de un modelo de piel reproducible y fiable.

Además existe una necesidad real de encontrar un nuevo sustituto de piel que se pueda utilizar para el tratamiento de trastornos cutáneos y/o pérdidas de sustancia cutánea.

Todavía existe una necesidad real de encontrar un nuevo sustituto de piel que se pueda manipular fácilmente y que no represente un alto riesgo de desgarramiento durante su manipulación.

Descripción de la invención

Precisamente, la presente invención tiene como objeto responder a esta necesidad proporcionando un método de preparación de un sustituto de piel que comprende las siguientes etapas:

- a. cultivo de fibroblastos en un medio M1 de cultivo de fibroblastos;
- b. siembra de una matriz que comprende colágeno con fibroblastos obtenidos en la etapa a;
- c. cultivo de los fibroblastos sembrados en la matriz que comprende colágeno en un medio M2 de cultivo de fibroblastos, formando la matriz y los fibroblastos cultivados un sustituto de dermis;
- d. cultivo de melanocitos en un medio M3 de cultivo de melanocitos;
- e. cultivo de queratinocitos en un medio M4 de cultivo de queratinocitos;
- f. mezcla de melanocitos obtenidos en la etapa d con queratinocitos obtenidos en la etapa e;
- g. siembra del sustituto de dermis obtenido en la etapa c con la mezcla obtenida en la etapa f;
- h. cultivo del sustituto de dermis sembrado en la etapa g en un medio M5 de cultivo de piel formando de ese modo el sustituto de piel.

en el que el medio M2 comprende ácido ascórbico o un ascorbato, el medio M5 comprende ácido hialurónico o un hialuronato y la siembra en la etapa g se realiza con una proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 9 a 19.

En la presente, el término "comprender" puede significar del mismo modo "incluir", "contener" o "englobar" por una parte así como "constituir" o "consistir en" por otra parte.

En la presente, el sustituto de dermis obtenido de acuerdo con el método de la invención es un tejido completo que reproduce las características de una dermis *in vivo*, es decir, que comprende macromoléculas de tipo proteico, en

particular fibras de colágena, glucosaminoglucanos, proteínas y fibroblastos funcionales.

En la presente, el sustituto de piel obtenido de acuerdo con el método de la invención es un tejido completo que reproduce las características de una piel *in vivo*, es decir, que comprende un epitelio pluriestratificado queratinizado que comprende queratinocitos que reproduce un estrato basal, un estrato espinoso, un estrato granuloso y un estrato córneo histológicamente normales, melanocitos basales en contacto con un sustituto de dermis que contiene fibroblastos funcionales.

En la presente, todos los fibroblastos, melanocitos, queratinocitos susceptibles de ser utilizados en el método de la invención pueden ser fibroblastos, melanocitos, queratinocitos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de fibroblastos, melanocitos y/o de queratinocitos obtenidos a partir de bancos de células que provienen, por ejemplo de la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur, N.º 25 de la calle Docteur Roux, F-75724 PARIS Cedex 15. También se puede tratar de fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos disponibles en el mercado, por ejemplo las células comercializadas por la compañía Thermofischer scientific, la compañía CellnTec o la compañía Promocell. También se puede tratar de de fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos aislados a partir de una muestra biológica de un animal, preferentemente un mamífero y/o de un ser humano, previamente aislada. Los fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos pueden ser fibroblastos, melanocitos, queratinocitos aislados independientemente de una biopsia o varias biopsias. Los fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos se pueden aislar independientemente de una biopsia o varias biopsias de un individuo, preferentemente un mamífero y/o un ser humano, con fines de un injerto de dicho sustituto de piel sobre dicho paciente. De manera independiente se puede tratar de fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos autólogos o heterólogos de un individuo.

En la presente, de manera ventajosa al menos dos tipos celulares entre los tres tipos celulares representados por los fibroblastos, melanocitos et queratinocitos son autólogos de un individuo.

En un modo de realización en particular, los fibroblastos, melanocitos y queratinocitos son de manera ventajosa células autólogas de un individuo.

Los fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos se pueden aislar independientemente de una biopsia o varias biopsias que provienen, por ejemplo de una piel de raza blanca, asiática o africana, de diferentes sitios anatómicos, por ejemplo de la espalda, cara, pecho, dorso de las manos, palmas de un ser humano.

De manera independiente se puede tratar de fibroblastos, melanocitos y/o de queratinocitos aislados independientemente de biopsias de piel, preferentemente de un ser humano, que presenta una o varias patologías cutáneas, por ejemplo manchas de envejecimiento (lentigo actínico), melasma, vitiligo, nevus o melanoma.

También se puede tratar de de fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos independientemente modificados por vía genética, por ejemplo con retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno asociados (AAV). Por ejemplo, se puede tratar de fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos que sobreexpresan independientemente al menos una proteína, por ejemplo una proteína elegida entre el colágeno VII, las queratinas 5, 14, y/o que subexpresan al menos una proteína, por ejemplo a través de la técnica ARN horquillado corto (ARNsh) o ARN de interferencia corto (ARNsi), por ejemplo el colágeno VII. Por ejemplo, se puede tratar de fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos independientemente modificados por vía genética tal como se describe en Pendaries V *et al.*, JID 2012 [1]; Petek LM *et al.*, Mol ther 2010 [2]. Por ejemplo, se puede tratar de fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos independientemente modificados por vía genética o no, por ejemplo la célula Ker-CT identificada con la referencia CRL-4048 de la ATCC, la célula TelCOFS02MA con la referencia CRL-4005 de la ATCC.

También se puede tratar de de fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos obtenidos de la línea celular, por ejemplo la línea de queratinocitos HaCaT, la línea de fibroblastos WS1.

De manera preferente, los fibroblastos susceptibles de ser utilizados no comprenden fibroblastos irradiados 3T3.

También se puede tratar de fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos obtenidos de manera independiente a partir de células madre adultas, células madre pluripotentes inducidas, por ejemplo mediante mantenimiento de dichas células madre adultas y/o de células madre pluripotentes inducidas por ejemplo mediante la introducción de genes Oct3/4, Sox 2, KLF4, c-Myc y a continuación diferenciadas gracias cócteles de factores, por ejemplo ácido retinoico y/o BMP-4, en una línea celular. También se puede tratar de células madre adultas y/o células madre pluripotentes inducidas mediante técnicas no virales basadas en la utilización de nanopartículas, por ejemplo nanopartículas de poliamidoamina terminadas con arginina. El experto en la materia, a partir de sus conocimientos generales, sabrá elegir el método y/o las células. Por ejemplo, se puede tratar de fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos obtenidos con el método que se describe en Kogut *et al.*, Methods Mol Biol 2014 [3], en Ohta *et al.*, Methods Mol Biol, 2013 [4], y/o en Revilla *et al.*, J Tissue Eng Regen Med, 2015 [5].

En la presente, por medio M1 de cultivo de fibroblastos se hace referencia a cualquier medio conocido por el experto en la materia adaptado para el cultivo de fibroblastos. Por ejemplo, se puede tratar de un medio disponible en el

mercado, por ejemplo un medio: medio esencial mínimo de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) comercializado por la compañía Gibco que comprende en particular una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas de azúcares, por ejemplo glucosa, o un medio Fibrolife comercializado por la compañía Cell Systems

5 Tabla 1: composición del medio: medio esencial mínimo de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM)

Composición	Concentración (mg/l)
Aminoácidos	
Glicina	84
Clorhidrato de L-arginina	84
L-Cistina 2HCl	63
L-Glutamina	580
Clorhidrato de L-histidina-H ₂ O	42
L-Isoleucina	105
L-Leucina	105
Clorhidrato de L-lisina	146
L-Metionina	30
L-Fenilalanina	66
L-Serina	42
L-Treonina	95
L-Triptófano	16
L-Tirosina	72
L-Valina	94
Vitaminas	
Cloruro de colina	4
Pantotenato de D-calcio	4
Ácido Fólico	4
Niacinamida	4
Clorhidrato de piridoxina	4
Riboflavina	0,4
Clorhidrato de Tiamina	4
i-Inositol	7,2
Sales inorgánicas	
Cloruro de Calcio (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	264
Nitrato Férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,1
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	200
Cloruro de Potasio (KCl)	400
Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	3700
Cloruro de Sodio (NaCl)	6400
Fosfato de Sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	141
Otros compuestos	
D-Glucosa (Dextrosa)	1000
Piruvato Sódico	110

En la presente, el medio M1 puede comprender además complementos, en particular suero de ternero fetal (SVF).

10 En la presente, el medio M1 puede comprender por ejemplo de un 5 a un 15 % en peso, de un 7,5 a un 12,5 % en peso, 10 % en peso de suero de ternero fetal (SVF) con respecto al peso total del medio.

15 En la presente, el medio M1 puede comprender al menos un compuesto antifúngico y/o antibiótico. Por ejemplo, se puede tratar de cualquier compuesto antifúngico y/o antibiótico conocido por el experto en la materia y/o disponible en el mercado. Por ejemplo, se puede tratar de al menos un compuesto antifúngico elegido entre el grupo que comprende Anfotericina B, ketoconazol y una mezcla de los mismos. Por ejemplo, se puede tratar de al menos un compuesto antibiótico elegido entre el grupo que comprende penicilina, estreptomycin, ciprofloxacina y una mezcla de los mismos.

20 En la presente, el medio M1 puede comprender de un 0,1 a un 10 % en peso, de un 5 a un 5 % en peso, 1 % en peso de antifúngico con respecto al peso total del medio.

En la presente, el medio M1 puede comprender de un 0,1 a un 10 % en peso, de un 5 a un 5 % en peso, 1 % en peso de antibióticos con respecto al peso total del medio.

25 En la presente el medio M1 y/o el conjunto de sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

Por « de calidad clínica » en la presente se hace referencia al hecho que el componente o el medio haya sido reconocido por la autoridad competente, adaptado para una utilización en clínica en un territorio dado.

5 En la presente, la etapa a. de cultivo de fibroblastos se puede realizar a una temperatura comprendida de 30 a 40 °C, de 35 a 39 °C, igual a 37 °C.

En la presente, la duración del cultivo de fibroblastos de la etapa a. puede comprender de 5 a 21 días, de 5 a 15 días, de 8 a 15 días.

10 En la presente, la duración del cultivo de fibroblastos de la etapa a. se puede realizar en una atmósfera controlada que comprende de un 5 a un 10 % de CO₂, por ejemplo en una atmósfera que comprende al menos un 5 % de CO₂.

15 De acuerdo con la invención, la etapa a. de cultivo de fibroblastos se puede realizar en un autoclave a una temperatura de 30 a 40 °C, de 32 a 40 °C, igual a 37 °C y en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5 % de CO₂.

20 De acuerdo con la invención, la etapa a. de cultivo de fibroblastos se puede realizar en cualquier recipiente de cultivo adaptado conocido por el experto en la materia. Se puede tratar de una placa de Petri, un matraz de cultivo con una capacidad de 25 a 75 cm², de 25, 75 o 175 cm².

De acuerdo con la invención, los fibroblastos obtenidos por cultivo de acuerdo con la etapa a. pueden formar una capa de células de confluencia en el recipiente de cultivo. Por ejemplo, los fibroblastos pueden tener de un 70 a un 100 % de confluencia, preferentemente un 100 % de confluencia.

25 De acuerdo con la invención, cuando el cultivo de acuerdo con la etapa a. corresponde a una capa de células de confluencia o no, el método puede comprender además:

- una etapa a' de eliminación del medio de cultivo, aclarado de las células con una solución, eliminación de la solución de aclarado,
- 30 - una etapa a" de separación de las células por tripsinización, y
- una etapa a''' de sedimentación o centrifugación.

35 De acuerdo con la invención, en la etapa a' la eliminación del medio de cultivo se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia adaptado. Por ejemplo, se puede tratar de una aspiración del medio, un cambio del contenido con el fin de eliminar el medio de cultivo.

40 De acuerdo con la invención, en la etapa a' el aclarado de las células se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, mediante inmersión, aspersión, incubación de las células en una solución de aclarado.

En la presente, por solución de aclarado se hace referencia a cualquier solución de aclarado de células conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar una solución tampón HBSS (Solución Salina Equilibrada de Hank) a pH comprendido de 7,2 a 7,4.

45 Tabla 2: composición del medio HBSS

Compuestos	Peso molecular	Concentración (mg/l)	mM
Sales inorgánicas			
Cloruro de potasio	75	400	5,333335
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	136	60	0,4411
Bicarbonato de Sodio	84	350	4,16
Cloruro de sodio	58	8000	137,93
Fosfato de Sodio dibásico anhidro (Na ₂ HPO ₄)	142	48	0,338
Otros compuestos			
D glucosa (Dextrosa)	180	1000	5,55
Rojo fenólico	376,4	10	0,0265

También se puede tratar de una solución tampón disponible en el mercado, por ejemplo un tampón fosfato salino (PBS), una solución equilibrada de Hank comercializada respectivamente por la compañía Gibco, Sigma Aldrich, Lonza.

De acuerdo con la invención, en la etapa a' la eliminación de la solución de aclarado se puede realizar con cualquier método conocido por el experto en la materia adaptado. Por ejemplo, se puede tratar de una aspiración de la solución de aclarado, de un cambio del contenido con el fin de eliminar la solución de aclarado.

5 De acuerdo con la invención, la etapa a" de tripsinización se puede realizar por inmersión de las células en una solución tampón (ST) que comprende tripsina, seguido por la adición de Suero de Ternero Fetal (SVF) con el fin de detener la reacción enzimática.

10 De acuerdo con la invención, la solución tampón (ST) puede ser cualquier solución tampón conocida por el experto en la materia susceptible de ser utilizada en un método de tripsinización. Por ejemplo, se puede tratar de un tampón fosfato salino (PBS), de una solución equilibrada de Hank comercializada respectivamente por la compañía Gibco, Sigma Aldrich, Lonza.

15 De acuerdo con la invención la cantidad de tripsina añadida en la solución tampón (ST) de esta comprendida entre un 0,01 y un 0,05 % en peso con respecto al peso total.

De acuerdo con la invención la duración de la incubación en la solución tampón que comprende tripsina antes de añadir SVF en la solución tampón (ST) puede comprender entre 2 y 10 min.

20 De acuerdo con la invención la cantidad de SVF añadida en la solución tampón (ST) puede comprender de un 5 a un 20 % en volumen con respecto al volumen total.

25 De acuerdo con la invención, la etapa a"" de sedimentación se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de una sedimentación o una centrifugación a una velocidad de 800 a 1400 vueltas por minuto, por ejemplo igual a 1200 vueltas por minuto.

De acuerdo con la invención, la etapa a"" de centrifugación se puede realizar durante un periodo de tiempo de 4 a 10 min por ejemplo igual a 5 minutos.

30 De acuerdo con la invención, la etapa a"" de sedimentación se puede realizar con cualquier dispositivo conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de una centrifugadora giratoria comercializada por las compañías Eppendorf o Jouan.

35 En la presente por « matriz que comprende colágeno » se hace referencia a cualquier matriz que comprende colágeno conocida por el experto en la materia susceptible de siembra con células. Por ejemplo, se puede tratar de una matriz de colágeno que corresponde a un gel de colágeno de tipo I no estirado, preferentemente que no impone una organización preferente de los fibroblastos tal como se describe en Bell *et al.*, 1979 [6]. Por ejemplo, se puede tratar de una matriz con una densidad / concentración de colágeno, preferentemente colágeno de tipo I, con una superficie de 25 a 500 cm². Por ejemplo, se puede tratar de una matriz que comprende colágeno disponible en el mercado, por ejemplo, se puede tratar de una matriz que comprende colágeno comercialidad por la compañía Integra.

45 De manera ventajosa, la matriz que comprende colágeno puede ser una matriz de regeneración dérmica. La matriz de regeneración dérmica se puede elegir en particular entre las matrices comercializadas con las denominaciones Integra (marca registrada) y Matriderm (marca registrada) por las compañías Integra Life Science Corporation y MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG respectivamente. De manera ventajosa, y a diferencia de las otras matrices que comprenden colágeno, las matrices de regeneración dérmica tales como las mencionadas anteriormente ya están modeladas, lo que favorece a la reconstrucción del equivalente de piel.

50 En un modo de realización, la matriz que comprende colágeno puede ser una matriz que comprende colágeno reticulado y al menos un glucosaminoglucano, por ejemplo 6-sulfato de condroitina. Por ejemplo, se puede tratar de la matriz Integra (marca registrada) comercializada por la compañía Integralife Sciences y/o de la matriz obtenida de acuerdo con el método que se describe en el documento de Boyce ST *et al.*, 1988 [7].

55 En otro modo de realización, la matriz que comprende colágeno puede ser una matriz que comprende fibras de colágeno de estructura nativa y de elastina. Por fibras de colágeno de estructura nativa se hace referencia en particular a fibras no reticuladas químicamente. Por ejemplo, se puede tratar de la matriz Matriderm comercializada por la compañía MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG y/o de la matriz obtenida de acuerdo con el método que se describe en el documento de Hafemann *et al.*, Burns 1999 [8].

60 En la presente, el espesor de la matriz que comprende colágeno puede ser de 1,0 a 3,0 mm (extremos incluidos) antes de la siembra con los fibroblastos. En un modo de realización en particular, el espesor de la matriz que comprende colágeno puede ser estrictamente superior a 1,0 mm antes de la siembra con los fibroblastos.

65 En la presente, la siembra de la etapa b se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de una aplicación, por ejemplo por aspersión de un medio de cultivo que

comprende los fibroblastos sobre la matriz, mediante depósito por trasplante de las células sobre la matriz, mediante deposición de un medio de cultivo que comprende las células en suspensión, mediante impresión 3D por ejemplo tal como se describe en Wonhye Lee *et al.*, « Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication. » *Biomaterials*, 2009, Mar; 30 (8): 1587-95 [7].

5 En la presente, cuando la etapa a comprende la etapa a", el método de la invención puede comprender, antes de la etapa b de siembra, una etapa b1 de resuspensión de las células centrifugadas en el medio M1.

10 En la presente, la siembra de la etapa b de una matriz que comprende colágeno se puede realizar a una densidad de 20 000 a 50 000 fibroblastos/cm², preferentemente de 30 000 fibroblastos/cm² de superficie de la matriz que comprende colágeno. En un modo de realización en particular, la densidad de fibroblastos puede ser estrictamente inferior a 50 000 fibroblastos / cm² de matriz que comprende colágeno.

15 En la presente el medio M2 de cultivo de fibroblastos puede ser cualquier medio conocido por el experto en la materia adaptado para el cultivo de fibroblastos que comprende además de ácido ascórbico o ascorbato. Por ejemplo, se puede tratar de un medio disponible en el mercado, por ejemplo un medio: medio esencial mínimo de Eagle Modificado con Dulbecco (DMEM) que comprende en particular una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas de azúcares, por ejemplo glucosa, que comprende además de ácido ascórbico o ascorbato.

20 En la presente, el medio M1 puede comprender además complementos, en particular suero de ternero fetal (SVF).

En la presente, el medio M2 puede comprender de un 5 a un 15 % en peso, de 7,5 a 12,5 % en peso, 10 % en peso de suero de ternero fetal (SVF) con respecto al peso total del medio.

25 En la presente, el medio M2 puede comprender al menos un compuesto antifúngico y/o antibiótico. Por ejemplo, se puede tratar de cualquier compuesto antifúngico y/o antibiótico conocido por el experto en la materia y/o disponible en el mercado. Por ejemplo, se puede tratar de al menos un compuesto antifúngico elegido entre el grupo que comprende Anfotericina B, ketoconazol y una mezcla de los mismos. Por ejemplo, se puede tratar de al menos un compuesto antibiótico elegido entre el grupo que comprende penicilina, estreptomycin, ciprofloxacina y una mezcla de los mismos.

30 En la presente, el medio M2 puede comprender de un 0,1 a un 10 % en peso, de un 5 a un 5 % en peso, 1 % en peso de antifúngico con respecto al peso total del medio.

35 En la presente, el medio M2 puede comprender de un 0,1 a un 10 % en peso, de un 5 a un 5 % en peso, igual a un 1 % en peso de antibióticos con respecto al peso total del medio.

40 En la presente, el medio M2 comprende ácido ascórbico o ascorbato o un derivado de los mismos. Por ejemplo, el medio M2 puede comprender ácido ascórbico o ascorbato a una concentración de 20 a 60 mg.ml⁻¹, por ejemplo de 30 a 55 mg.ml⁻¹, igual a 50 mg.ml⁻¹.

De manera ventajosa, el ácido ascórbico permite en particular favorecer la remodelación de la matriz que comprende colágeno estimulando la síntesis de colágeno por los fibroblastos.

45 En la presente el medio M2 y/o el conjunto de sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

En la presente, la etapa c. de cultivo de fibroblastos se puede realizar a una temperatura comprendida de 30 a 40 °C, de 35 a 39 °C, igual a 37 °C.

50 En la presente, la duración del cultivo de la etapa c. de fibroblastos puede ser de 5 a 12 días, de 7 a 10 días.

En la presente, el cultivo de la etapa c. de fibroblastos se puede realizar en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5 % de CO₂.

55 En la presente, la etapa c. de cultivo de fibroblastos sembrados en la matriz que comprende colágeno puede comprender:

- una primera etapa c' de cultivo de 18 a 28 horas en presencia de un medio M2¹ de cultivo de fibroblastos que no comprende ni ácido ascórbico ni ascorbato, y
- 60 - una segunda etapa c'' de cultivo, de al menos 2 días en presencia de un medio M2² de cultivo de fibroblastos que comprende ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos.

En este modo de realización, el medio M2¹ de cultivo de fibroblastos corresponde al medio M2 tal como se ha definido anteriormente que no comprende ni ácido ascórbico ni ascorbato ni derivado de los mismos. En la presente el medio M21 y/o el conjunto de sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

En este modo de realización, el medio M2² de cultivo de fibroblastos corresponde al medio M2 tal como se definido anteriormente que comprende ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos. En la presente el medio M22 y/o el conjunto de sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

5 En la presente, la etapa c' de cultivo se puede realizar a una temperatura comprendida de 30 a 45 °C, de 35 a 39 °C, igual a 37 °C.

En la presente, la duración del cultivo de la etapa c' puede ser de 19 a 27 horas, por ejemplo de 24 horas.

10 En la presente, la etapa c'' de cultivo se puede realizar a una temperatura comprendida de 30 a 40 °C, de 35 a 39 °C, igual a 37 °C.

En la presente, la duración del cultivo de la etapa c'' puede comprender entre 5 a 12 días, igual a 7 días.

15 Los inventores también han demostrado de manera ventajosa que la matriz y los fibroblastos cultivados obtenidos en la etapa c. forman una estructura que corresponde a un sustituto de dermis.

De manera ventajosa, los inventores también han demostrado que la etapa c' de cultivo corresponde a una etapa de adhesión y de colonización de la matriz por los fibroblastos y la etapa c'' permite de manera ventajosa una remodelación de la matriz que comprende los fibroblastos con el fin de formar un sustituto de dermis. En particular sucesión de las etapas c' y c'' con la utilización respectivamente de los medios M21 y M22 permitirá formar de manera ventajosa un sustituto de dermis en el que los fibroblastos no proliferan pero colonizan la matriz que comprende colágeno a la vez que permiten de manera ventajosa la producción de colágeno por los propios fibroblastos permitiendo de este modo una remodelación de la dermis.

25 En otros términos, el producto obtenido al final de la etapa c. se puede utilizar de manera ventajosa como sustituto de dermis. En particular, este producto comprende todas las características fisicoquímicas de la dermis a partir de la que se pueden obtener los fibroblastos.

30 De acuerdo con la invención, la etapa d. de cultivo de melanocitos se puede realizar en cualquier recipiente de cultivo adaptado conocido por el experto en la materia. Se puede tratar de una placa de Petri, un matraz de cultivo con una capacidad de 25 a 75 cm², de 25, 75 o 175 cm².

35 En la presente el medio M3 de cultivo de melanocitos puede ser cualquier medio conocido por el experto en la materia adaptado para el cultivo de melanocitos. Por ejemplo, se puede tratar de un medio disponible en el mercado, por ejemplo un medio disponible en el mercado comercializados por la compañía Promocell con la referencia « Medio de Melanocitos M2 », « MBM » comercializados por la compañía Promocell, en un medio MCDB 153 comercializado por la compañía Sigma-Aldrich que comprende en particular una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas de azúcares, por ejemplo glucosa, tal como se representa en la tabla 3 que sigue a continuación:

40

Tabla 3: composición del medio MCDB 153

Composición	Concentración en g.l ⁻¹
Metavanadato de Amonio	0,000000585
Cloruro de Calcio Anhidro	0,00333
Sulfato Cúprico 5 H ₂ O	0,00000275
Sulfato Ferroso 7 H ₂ O	0,00139
Cloruro de Magnesio	0,05713
Sulfato de Manganeso	0,000000151
Ácido Molíbdico 4 H ₂ O (amonio)	0,00000124
Cloruro de Níquel·6 H ₂ O	0,00000012
Cloruro de Potasio	0,11183
Acetato de Sodio (anhidro)	0,30153
Cloruro de Sodio	7,599
Metasilicato de Sodio 9 H ₂ O	0,000142

ES 2 625 768 T3

Composición	Concentración en g.l ⁻¹
Fosfato de Sodio dibásico (anhidro)	0,284088
Selenito de Sodio	0,0000038
Cloruro Estannoso·2 H ₂ O	0,000000113
Sulfato de Cinc·7 H ₂ O	0,000144
L-Alanina	0,00891
L-Arginina·HCl	0,2107
L-Asparagina ·H ₂ O	0,015
Ácido L-Aspártico	0,00399
L-Cisteína·HCl· H ₂ O	0,04204
Ácido L-Glutámico	0,01471
L-Glutamina	0,8772
Glicina	0,00751
L-Histidina·HCl· H ₂ O	0,01677
L-Isoleucina	0,001968
L-Leucina	0,0656
L-Lisina·HCl	0,01827
L-Metionina	0,00448
L-Fenilalanina	0,00496
L-Prolina	0,03453
L-Serina	0,06306
L-Treonina	0,01191
L-Triptófano	0,00306
L-Tirosina·2Na	0,00341
L-Valina	0,03513
D-Biotina	0,0000146
Cloruro de Colina	0,01396
Ácido fólico	0,00079
mio-Inositol	0,01802
Niacinamida	0,00003663
Ácido D-Pantoténico (hemicálcico)	0,000238
Piridoxina·HCl	0,00006171
Riboflavina	0,0000376
Tiamina·HCl	0,000337

Composición	Concentración en g.l ⁻¹
Vitamina B-12	0,000407
Adenina·HCl	0,03088
D-Glucosa	1,081
HEPES	6,6
Rojo Fenol·Na	0,001242
Putrescina·2HCl	0,000161
Ácido Pirúvico ·Na	0,055
Ácido Tióctico	0,000206
Timidina	0,000727

También se puede tratar de un medio disponible en el mercado modificado, por ejemplo el medio MCDB153 que comprende además aminoácidos complementarios, por ejemplo de tirosina, metionina o una mezcla de los mismos, sales inorgánicas adicionales, por ejemplo bicarbonato de sodio (NaHCO₃).

5

En la presente, el medio M3 puede comprender además al menos un complemento elegido entre extracto de pituitaria de bovino (BPE), insulina, penicilina estreptomina (PS), hidrocortisona, suero de caballo, suero de ternero, factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor de estimulación de Granulocitos y Macrófagos (« Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos » (GM-CSF)), SCF o una mezcla cualquiera de los mismos.

10

En la presente, el medio M3 puede comprender de un 0,1 a un 10 %, en peso, de un 5 a un 5 % en peso, 1 % en peso de penicilina estreptomina (PS) con respecto al peso total del medio.

15

En la presente, el medio M3 puede comprender una concentración de 1,25 a 1,60 µM, de 1,40 a 1,55 µM, de 1,45 µM de hidrocortisona.

20

En la presente, el medio M3 puede comprender una concentración de 100 a 160 µg.ml⁻¹, de 110 a 150 µg.ml⁻¹, igual a 140 µg.ml⁻¹ extracto de pituitaria de bovino (BPE).

20

En la presente, el medio M3 puede comprender una concentración de 15 a 25 µg.ml⁻¹, igual a 20 µg.ml⁻¹ de insulina.

25

En la presente, el medio M3 puede comprender una concentración de 0,01 a 0,2 µg.ml⁻¹, de 0,01 a 0,1 µg.ml⁻¹, igual a 0,01 µg.ml⁻¹ de GM-CSF.

25

En la presente, el medio M3 puede comprender una concentración de 0,004 a 0,2 µg.ml⁻¹, de 0,01 a 0,15 µg.ml⁻¹, igual a 0,05 µg.ml⁻¹ de SCF.

30

En la presente, el medio M3 puede comprender una concentración de 0,1 a 10 ng.ml⁻¹, de 0,5 a 5 ng.ml⁻¹, de 0,8 a 2 ng.ml⁻¹, igual a 1 ng.ml⁻¹ de bFGF.

30

En la presente, el medio M3 puede comprender de un 1 a un 5 % en peso, de un 2 a un 4 % en peso, 3 % en peso de suero de caballo o de ternero con respecto al peso total del medio.

35

En la presente el medio M3 y/o el conjunto de sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

En la presente, la etapa d. de cultivo de melanocitos se puede realizar a una temperatura ambiente, por ejemplo, a una temperatura de 30 a 40 °C, por ejemplo igual a 37 °C.

40

En la presente, la duración del cultivo de la etapa d. puede comprender entre 15 a 28 días.

En la presente, el cultivo de la etapa d. de melanocitos se puede realizar en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5 % de CO₂.

45

De acuerdo con la invención, los melanocitos obtenidos por cultivo de acuerdo con la etapa d. pueden formar una capa de células de confluencia en el recipiente de cultivo. Por ejemplo, los melanocitos pueden formar una capa de

células de un 50 a un 100 % de confluencia.

De acuerdo con la invención, durante el cultivo de acuerdo con la etapa d., corresponda a una capa de células de confluencia o no, el método puede comprender además:

- una etapa d' de eliminación del medio de cultivo, aclarado de las células con una solución, eliminación de la solución de aclarado,
- etapa d'' de separación de las células por tripsinización, y
- una etapa d''' de sedimentación.

En la presente, en la etapa d', la eliminación del medio de cultivo se puede realizar con cualquier método conocido por el experto en la materia adaptado. Por ejemplo, se puede tratar de una aspiración del medio, un cambio del contenido con el fin de eliminar el medio de cultivo.

En la presente, en la etapa d', el aclarado de las células se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, por aspersión, inmersión de las células en una solución de aclarado.

En la presente, por solución de aclarado de melanocitos se hace referencia a cualquier solución de aclarado de melanocitos conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar una solución tampón HBSS, por ejemplo de la solución que se ha descrito en la tabla 2 mencionada anteriormente, de tampón fosfato salino (PBS) a pH comprendido de 7,2 a 7,4. También se puede tratar de una solución tampón disponible en el mercado por ejemplo un tampón fosfato salino (PBS), una solución equilibrada de Hank comercializada respectivamente por la compañía Gibco, Sigma Aldrich, Lonza.

En la presente, en la etapa d', la eliminación de la solución de aclarado se puede realizar con cualquier método conocido por el experto en la materia adaptado. Por ejemplo, se puede tratar de una aspiración de la solución de aclarado, un cambio del contenido con el fin de eliminar la solución de aclarado.

De acuerdo con la invención, la etapa d'' de tripsinización se puede realizar por inmersión de las células en una solución tampón (ST) que comprende tripsina, seguido por la adición de Suero de Ternero Fetal (SVF) con el fin de detener la reacción enzimática.

De acuerdo con la invención, la solución tampón (ST) puede ser una solución tampón tal como se ha definido anteriormente.

De acuerdo con la invención la cantidad de tripsina añadida en la solución tampón (ST) puede ser de un 0,01 a un 0,05 % en peso con respecto al peso total.

De acuerdo con la invención la duración de la incubación de tripsina antes de añadir SVF en la solución tampón puede ser de 2 a 5 min.

En la presente la cantidad de SVF añadido en la solución (ST) puede comprender de un 5 a un 20 % en volumen con respecto al volumen total.

De acuerdo con la invención, la etapa d''' de sedimentación se puede realizar por sedimentación, por centrifugación mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de una centrifugación a una velocidad de 800 a 1200 vueltas por minuto.

De acuerdo con la invención, la etapa d''' de centrifugación se puede realizar durante un periodo de tiempo de 5 a 10 min.

En la presente, la etapa d''' de centrifugación se puede realizar con cualquier dispositivo conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de una centrifugadora giratoria comercializada por las compañías Eppendorf o Jouan.

En la presente, la etapa d''' de centrifugación permite sedimentar las células con el fin de separarlas del medio. El experto en la materia, de acuerdo con sus conocimientos generales, sabrá adaptar/modificar la etapa d''' de centrifugación mediante cualquier técnica conocida que permita sedimentar células en un medio.

De acuerdo con la invención, la etapa e. de cultivo de queratinocitos se puede realizar en cualquier recipiente de cultivo adaptado conocido por el experto en la materia. Se puede tratar de una placa de Petri, un matraz de cultivo con una capacidad de 25 a 75 cm², de 25, 75 o 125 cm².

En la presente el medio M4 de cultivo de queratinocitos puede ser cualquier medio conocido por el experto en la materia adaptado para el cultivo de melanocitos. Por ejemplo, se puede tratar de un medio disponible en el mercado, por ejemplo un medio KSFM comercializado por la compañía Life-technology, KGM comercializado por la compañía

- Lonza, provitro en un medio MCDB 153 comercializado por la compañía Sigma-Aldrich que comprende en particular una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas de azúcares, por ejemplo glucosa. También se puede tratar de un medio disponible en el mercado modificado, por ejemplo el medio MCDB153 que comprende una concentración de cloruro de sodio de 0,100 a 0,110 M/l, por ejemplo de 0,104 M/l, una concentración de Hepes de 2 a 3×10^{-2} M/l, por ejemplo de $2,29 \times 10^{-2}$ M/l, una concentración de bicarbonato de sodio de $1,10 \times 10^{-2}$ M/l a $1,25 \times 10^{-2}$ M/l, por ejemplo de $1,19 \times 10^{-2}$ M/l, y que comprende una concentración de a arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina, valina y colina duplicará con respecto a las concentraciones del medio MCDB153 no modificado.
- En la presente, el medio M4 puede comprender además complementos elegidos entre factores de crecimiento, por ejemplo factor de crecimiento epitelial (EGF), extracto de pituitaria de bovino (BPE), insulina, penicilina-estreptomicina (PS), hidrocortisona o una mezcla cualquiera de los mismos. De manera ventajosa, el medio M4 puede comprender complementos de calidad clínica. Por ejemplo, se puede tratar de complementos elegidos entre factores de crecimiento, por ejemplo factor de crecimiento epitelial (EGF), insulina, penicilina-estreptomicina (PS), hidrocortisona o una mezcla cualquiera de los mismos.
- En la presente, el medio M4 puede comprender por ejemplo de un 0,5 a un 5 % en peso, de un 0,75 a un 3 % en peso, 1 % en peso de penicilina-estreptomicina (PS) con respecto al peso total del medio.
- En la presente, el medio M4 puede comprender una concentración de 1,25 a 1,60 μ M, de 1,40 a 1,55 μ M, de 1,45 μ M de hidrocortisona.
- En la presente, el medio M4 puede comprender una concentración de 50 a 90 μ g.ml⁻¹, de 60 a 80 μ g.ml⁻¹, de 70 μ g.ml⁻¹ de extracto de pituitaria de bovino (BPE).
- En la presente, el medio M4 puede comprender una concentración de 3 a 8 μ g.ml⁻¹, por ejemplo igual a 5 μ g.ml⁻¹ de insulina.
- En la presente, el medio M4 puede comprender una concentración de 5 a 15 ng.ml⁻¹, de 6,5 a 13 ng.ml⁻¹, igual a 10 ng.ml⁻¹ de factor de crecimiento epitelial (EGF).
- En la presente el medio M4 y/o el conjunto de sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.
- En la presente, la etapa e. de cultivo de queratinocitos se puede realizar a una temperatura de 25 a 39 °C, por ejemplo igual a 37 °C.
- En la presente, la duración del cultivo de la etapa e. puede comprender de 15 a 28 días.
- En la presente, el cultivo de la etapa e. de queratinocitos se puede realizar en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5 % de CO₂.
- De acuerdo con la invención, los queratinocitos obtenidos por cultivo de acuerdo con la etapa e. pueden formar una monocapa de células en el recipiente de cultivo. Por ejemplo, se puede tratar de una monocapa de células cercana a la confluencia, por ejemplo de un 50 a un 80 % de confluencia en el recipiente de cultivo.
- De acuerdo con la invención, cuando el cultivo de acuerdo con la etapa e. corresponde a una monocapa de células cercanas a la confluencia, preferentemente de un 50 a un 80 % de confluencia, el método puede comprender además:
- una etapa e' de eliminación del medio de cultivo, aclarado de las células con una solución, eliminación de la solución de aclarado,
 - una etapa e'' de separación de las células por tripsinización, y
 - una etapa e''' de centrifugación.
- En la presente, en la etapa e', la eliminación del medio de cultivo se puede realizar con cualquier método conocido por el experto en la materia adaptado. Por ejemplo, se puede tratar de una aspiración del medio, un cambio del contenido con el fin de eliminar el medio de cultivo.
- En la presente, en la etapa e', el aclarado de las células se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, mediante inmersión, aspersión, incubación de las células en una solución de aclarado de queratinocitos.
- En la presente, par solución de aclarado de queratinocitos se hace referencia a cualquier solución de aclarado de queratinocitos conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar una solución tampón PBS, HBSS, por ejemplo tal como se ha descrito en la tabla 2 mencionada anteriormente, a pH comprendido de 7,2 a 7,4. También se puede tratar de una solución tampón disponible en el mercado, por ejemplo un tampón fosfato salino

(PBS), una solución equilibrada de Hank comercializada respectivamente por la compañía Gibco, Sigma Aldrich, Lonza.

5 En la presente, en la etapa e', la eliminación de la solución de aclarado de queratinocitos se puede realizar con cualquier método conocido por el experto en la materia adaptado. Por ejemplo, se puede tratar de una aspiración de la solución de aclarado de queratinocitos, de un cambio del contenido con el fin de eliminar la solución de aclarado de queratinocitos.

10 De acuerdo con la invención, la etapa e" de tripsinización se puede realizar por inmersión de las células en una solución (S) que comprende tripsina, seguido de la adición de Suero de Ternero Fetal (SVF) con el fin de detener la reacción enzimática.

15 De acuerdo con la invención la cantidad de tripsina añadida en la solución (S) puede comprender de un 0,01 a un 0,05 % en peso con respecto al peso total de la solución.

De acuerdo con la invención la duración de la incubación de tripsina antes de añadir SVF en el medio puede comprender de 5 a 10 min.

20 En la presente la cantidad de SVF añadido en la solución (S) puede comprender de un 5 a un 20 % en peso con respecto al peso total de la solución.

25 De acuerdo con la invención, la etapa e''' de centrifugación se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de una centrifugación a una velocidad de 800 a 1200 vueltas por minuto.

De acuerdo con la invención, la etapa e''' de centrifugación se puede realizar durante un periodo de tiempo de 5 a 10 min.

30 En la presente, la etapa e''' de centrifugación se puede realizar con cualquier dispositivo conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de una centrifugadora giratoria comercializada por las compañías Eppendorf o Jouan.

35 En la presente la etapa f. de mezcla de melanocitos obtenidos en la etapa d. con queratinocitos obtenidos en la etapa e. se puede realizar con cualquier medio adecuado adaptado conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de una mezcla de células con agitación en un medio de cultivo.

En la presente, la mezcla de melanocitos y de queratinocitos de la etapa f se puede realizar con una proporción de melanocitos / queratinocitos en número de 1/20 a 1/15, igual a 1/19.

40 De manera ventajosa, los inventores han demostrado de manera sorprendente que cuando la mezcla de melanocitos y de queratinocitos se realiza con una proporción melanocitos / queratinocitos de 1/20 a 1/15, preferentemente igual a 1/19, el sustituto de piel obtenido presenta características estructurales/biológicas idénticas a las de una piel *in vivo*.

45 En un modo de realización preferente, la mezcla de melanocitos y de queratinocitos de la etapa f se realiza con una proporción melanocitos / queratinocitos en número de 1/20 a 1/15, igual a 1/19, y la matriz que comprende colágeno es una matriz de regeneración dérmica tal como se ha definido anteriormente.

50 En la presente, la siembra del sustituto de dermis de la etapa g se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de una aplicación, por ejemplo por aspersión del medio de cultivo que comprende una mezcla de melanocitos y de queratinocitos obtenidos en la etapa f., mediante depósito por trasplante de las células sobre el sustituto de dermis, por vertido gota a gota del medio de cultivo que comprende una mezcla de melanocitos y de queratinocitos obtenidos en la etapa f, por impresión 3D por ejemplo tal como se describe en Wonhye Lee *et al.*, « Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication." *Biomaterials*, 2009, Mar; 30 (8): 1587-95 [9].

60 En la presente, la siembra del sustituto de dermis de la etapa g se realiza con una proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 9 a 19. De hecho, los inventores han demostrado de manera sorprendente que cuando la siembra de la etapa g se realiza con una proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 9 a 19, el sustituto de piel obtenido presenta características estructurales/biológicas idénticas a las de una piel normal.

65 En un modo de realización preferente, la siembra del sustituto de dermis de la etapa g se realiza con una proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 9 a 19 y la matriz que comprende colágeno es una matriz de regeneración dérmica tal como se ha definido anteriormente.

ES 2 625 768 T3

5 En la presente por medio M5 de cultivo de piel se entiende cualquier medio conocido por el experto en la materia adaptado al cultivo de piel que comprende además ácido hialurónico o un hialuronato. Por ejemplo, se puede tratar de un medio disponible en el mercado, por ejemplo un medio Green modificado, es decir, que comprende 2/3 de medio « medio esencial mínimo de Eagle modificado con Dulbecco/Vogt » (DMEM); 1/3 de medio « F12 de Ham » y que comprende una mezcla de un 10 % de Suero de Ternero Fetal (SVF) comercializado por la compañía Gibco que comprende en particular una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, de azúcares, por ejemplo glucosa. También se puede tratar de un medio Green modificado, es decir, un medio Green exento de toxina de cólera, de triiodotironina, o de una mezcla del medio « Medio de Dulbecco Modificado con Iscove » (IMDM) y del medio MCDB153 que comprende un 10 % de SVF; o de una mezcla de IMDM / « queratinocitos de dermalife » que comprende un dermalife de SVF comercializado respectivamente por la compañía Gibco, Lifescience, Promocell y Sigma Aldrich.

15 En la presente, el medio M5 también puede comprender además de complementos elegidos entre el ácido hialurónico o un hialuronato, ácido ascórbico o un ascorbato o una mezcla de los mismos.

En la presente, el medio M5 puede comprender por ejemplo de 40 a 60 mg.l⁻¹, de 45 a 55 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹ de hialuronato o ácido hialurónico.

20 En la presente, el medio M5 puede comprender por ejemplo de 40 a 60 mg.l⁻¹, de 45 a 55 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹ de ácido ascórbico o ascorbato.

En la presente, la etapa h. de cultivo de piel se puede realizar a una temperatura comprendida de 25 a 40 °C, por ejemplo igual a 37 °C.

25 En la presente, la duración del cultivo de piel de la etapa h. puede comprender entre 6 y 21 días, por ejemplo de 8 a 15 días.

En la presente, el cultivo de piel de la etapa h. de piel se puede realizar en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5 % de CO₂.

30 De acuerdo con la invención, el cultivo de piel de la etapa h. de piel se puede realizar a una temperatura comprendida de 25 a 40 °C, por ejemplo igual a 37 °C y en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5 % de CO₂.

35 En la presente el medio M5 y/o cada uno de sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

En la presente la etapa h. puede comprender:

40 - una primera etapa h.¹ de cultivo de al menos 6 horas, preferentemente de 6 a 24 horas, en presencia de un medio M5¹ de cultivo y de un medio Green modificado, es decir, un medio Green exento de toxina de cólera, de triiodotironina, o de una mezcla del medio « Medio de Dulbecco Modificado con Iscove » (IMDM) y del medio MCDB153 que comprende un 10 % de SVF; o de una mezcla de IMDM / « queratinocitos de dermalife » que comprende un 10 % de SVF comercializado respectivamente por la compañía Gibco, Lifescience, Promocell y Sigma Aldrich.

45 En la presente, el medio M5 también puede comprender además complementos elegidos entre el ácido hialurónico o un hialuronato, ácido ascórbico o un ascorbato como una mezcla de los mismos.

50 En la presente, el medio M5 puede comprender por ejemplo de 40 a 60 mg.l⁻¹, de 45 a 55 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹ de hialuronato o ácido hialurónico.

En la presente, el medio M5 puede comprender por ejemplo de 40 a 60 mg.l⁻¹, de 45 a 55 mg.l⁻¹, 50 mg.l⁻¹ de ácido ascórbico o ascorbato.

55 En la presente, la etapa h. de cultivo de piel se puede realizar a una temperatura comprendida de 25 a 40 °C, por ejemplo igual a 37 °C.

60 En la presente, la duración del cultivo de piel de la etapa h. puede comprender entre 6 y 21 días, por ejemplo de 8 a 15 días.

En la presente, el cultivo de piel de la etapa h. de piel se puede realizar en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5 % de CO₂.

65 De acuerdo con la invención, el cultivo de piel de la etapa h. de piel se puede realizar a una temperatura comprendida de 25 a 40 °C, por ejemplo igual a 37 °C y en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5 % de CO₂.

En la presente el medio M5 y/o cada uno de sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

En la presente la etapa h. puede comprender:

- 5 - una primera etapa h.' de cultivo de al menos 6 horas, preferentemente de 6 a 24 horas, en presencia de un medio M5¹ de cultivo que no comprende ni ácido hialurónico, ni hialuronato, ni ácido ascórbico ni ascorbato,
- una segunda etapa h." de cultivo de 0 a 7 días, preferentemente de al menos 2 días, en presencia de un medio M5² de cultivo que comprende ácido hialurónico o un hialuronato y
10 - una tercera etapa h.'" de cultivo de al menos 2 días en un medio M5³ que comprende ácido hialurónico o un hialuronato y ácido ascórbico o un ascorbato.

El medio M5¹ de cultivo de sustituto de piel corresponde al medio M5 tal como se ha definido anteriormente no comprende ni ácido ascórbico ni ascorbato o derivado de los mismos.

15 En la presente el medio M5¹ y/o cada uno de sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

El medio M5² de cultivo de sustituto de piel corresponde al medio M5 tal como se ha definido anteriormente que comprende ácido hialurónico o un hialuronato a la vez que está exento de ácido ascórbico, ascorbato y un derivado de los mismos.

20 En la presente el medio M5² puede ser y/o cada uno de sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

El medio M5³ de cultivo de sustituto de piel corresponde al medio M5 tal como se ha definido anteriormente que comprende ácido hialurónico o un hialuronato y ácido ascórbico o ascorbato.

25 En la presente el medio M5³ puede ser un medio de calidad clínica.

En la presente invención, la etapa h' de cultivo se puede realizar mediante deposición en un medio de cultivo M5¹ del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa g.

30 En la presente, la etapa h' de cultivo se puede realizar a una temperatura comprendida de 25 a 40 °C, por ejemplo igual a 37 °C.

35 En la presente, la duración de la etapa h' de cultivo puede ser de 6 a 24 horas, por ejemplo de 8 a 24 horas, de 12 a 18 horas.

En la presente, la etapa h' de cultivo de piel se puede realizar en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5 % de CO₂.

40 De manera ventajosa, los inventores han demostrado que la etapa h' permite favorecer la adhesión de los melanocitos y queratinocitos sobre el sustituto de dermis.

45 En la presente invención, la etapa h" de cultivo se puede realizar mediante deposición en un medio de cultivo M5² del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h' o inmersión o submersión del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h' en un medio de cultivo M5².

En la presente, la etapa h" de cultivo se puede realizar a una temperatura comprendida de 25 a 40 °C, por ejemplo igual a 37 °C.

50 En la presente, la duración de la etapa h" de cultivo puede comprender de 0 a 7 días, preferentemente de 2 a 7 días.

En la presente, la etapa h" de cultivo de piel se puede realizar en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5. % de CO₂.

55 En la presente invención, la etapa h'" de cultivo se puede realizar mediante deposición en un medio de cultivo M5² del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h", inmersión del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h" en un medio de cultivo M5², o inmersión del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h", siendo dicho sustituto sumergido en dicho medio hasta la superficie de contacto de aire-líquido, o siendo dicho medio sumergido en la superficie del medio.

60 En la presente por « en la superficie del medio » se hace referencia a la inmersión del sustituto en el medio de para recubrir el sustituto en la totalidad de su altura sin inmersión de su parte superior.

65 En la presente, la etapa h'" de cultivo se puede realizar a una temperatura comprendida de 25 a 40 °C, por ejemplo igual a 37 °C.

En la presente, la duración de la etapa h''' de cultivo puede comprender de 2 a 7 días preferentemente 7 días.

En la presente, la etapa h''' de cultivo de piel se puede realizar en una atmósfera controlada que comprende al menos un 5 % de CO₂

5 De manera ventajosa, los inventores han demostrado que la inmersión del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h'' en un medio de cultivo M5³ que comprende ácido hialurónico o un hialuronato y ácido ascórbico o un ascorbato permite favorecer la formación de la unión dermo-epidérmica y asegura de ese modo una mejor polarización de las células del sustituto de dermis sembrado.

10 De manera ventajosa, los inventores también han demostrado que la inmersión hasta la superficie de contacto del aire-líquido o en la superficie del medio del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h'' en un medio de cultivo M5³ que comprende ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos y ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos permite una diferenciación de la epidermis que favorece de ese modo la formación de una capa córnea sobre el sustituto o equivalente.

15 De manera ventajosa, los inventores han demostrado que el método permite de manera ventajosa tener un sustituto de piel o equivalente de piel que comprende el conjunto de las capas componentes de las mismas. Además, el sustituto de piel obtenido de acuerdo con el método de la invención presenta características similares a las de la piel nativa a diferencia de los sustitutos de piel conocidos en el estado de la técnica.

20 De manera ventajosa, los inventores también han demostrado que el método permite obtener un sustituto de dermis y/o un sustituto de piel de un tamaño muy superior a los conocidos en el estado de la técnica. En particular, el método permite de manera ventajosa obtener un sustituto de dermis y/o un sustituto de piel con una superficie de 1 a 25 cm², por ejemplo de 5 a 25 cm².

Los inventores también han demostrado de manera ventajosa que el método permite obtener un sustituto o equivalente de dermis y/o un equivalente o sustituto de piel con una capacidad de amplificación mínima de 6.

30 Además, los inventores también han demostrado de manera ventajosa que el método de acuerdo con la invención permite obtener un sustituto de dermis y/o de piel manipulable con propiedades viscoelásticas que permiten de manera ventajosa evitar un desgarramiento/alteración físicos opcionales de dicho sustituto durante su manipulación.

35 Además, la duración de la preparación del sustituto de dermis y/o de piel de acuerdo con el método de la invención por lo general es inferior a 30 días, y por lo tanto es compatible con las exigencias para el cuidado de las quemaduras en particular.

40 La presente invención también tiene como objeto un sustituto de piel susceptible de ser obtenido mediante la realización del método tal como se ha definido anteriormente.

De manera ventajosa, los inventores han demostrado que el sustituto de piel comprende melanocitos a nivel de la capa basal formando una unidad epidérmica de melanización.

45 De manera ventajosa, el sustituto de piel susceptible de ser obtenido con el método de la invención, mediante la presencia de melanocitos presenta de manera ventajosa una pigmentación constitutiva.

50 De manera ventajosa, el sustituto de piel tiene un tamaño muy superior a los conocidos en el estado de la técnica que permite en particular cuando hay heridas extendidas, la aplicación de uno solo o de un número inferior de sustitutos de piel con respecto a los del estado de la técnica. La disminución del número de sustitutos de piel a aplicar también permite de manera ventajosa reducir los costes de tratamiento a la vez que se acelera esto último.

La presente invención también describe un sustituto de dermis susceptible de ser obtenido en la etapa c. Del método.

55 De manera ventajosa, el sustituto de dermis puede comprender colágeno de tipo IV neoformado.

De manera ventajosa el sustituto de dermis comprende al menos una matriz que comprende colágeno de tipo I en la que se reparten los fibroblastos. Además puede contener otros componentes de la matriz extracelular, por ejemplo moléculas tales como el colágeno en particular el colágeno IV, las lamininas, los glucosaminoglucanos.

60 De manera ventajosa, el sustituto de dermis tiene un tamaño muy superior a los conocidos en el estado de la técnica que permite en particular cuando hay heridas extendidas, la aplicación de uno solo o de un número inferior de sustitutos con respecto a los del estado de la técnica. La disminución del número de sustitutos a aplicar también permite de manera ventajosa reducir los costes de tratamiento a la vez que se acelera el tratamiento de parte, por ejemplo la puesta a disposición de un dispositivo único que cubre el conjunto de la superficie a tratar.

65

Los inventores también han demostrado que el sustituto de dermis y/o el sustituto de piel de acuerdo con la invención se pueden utilizar de manera ventajosa para cubrir las pérdidas de sustancia, por lo tanto el sustituto de dermis y/o el sustituto de piel de acuerdo con la invención se pueden utilizar de manera ventajosa como injerto.

5 Por lo tanto, la presente invención también tiene como objeto un injerto constituido por un sustituto de piel tal como se ha definido anteriormente o describe un injerto formado por un sustituto de dermis tal como se ha definido anteriormente.

10 En la presente, el injerto de acuerdo con la invención se puede utilizar como medio de tratamiento de un trastorno cutáneo y/o de una pérdida de sustancia cutánea. En particular, el injerto de acuerdo con la invención se puede utilizar como medio de tratamiento de un trastorno cutáneo y/o de una pérdida de sustancia cutánea elegido entre el grupo que comprende una quemadura, un defecto de cicatrización, relacionado con una herida traumática o con una herida crónica, un trastorno pigmentario, hemangioma y un cáncer cutáneo.

15 La presente solicitud describe un método de tratamiento de un trastorno de la piel que comprende el trasplante o el implante de un sustituto de piel o de un sustituto de dermis de acuerdo con la invención.

20 En la presente, el implante del sustituto de piel se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de la aplicación directa del sustituto sobre la zona a tratar, por ejemplo de acuerdo con el método que se describe en Peña, *et al.*, Use of Autologous Skin Equivalents With Artificial Dermal Matrix (Integra) in Donor Site Coverage in Radial Forearm Free Flaps: Preliminary Cases J Oral and Maxillofacial Surgery, 70: 10 10, 2012 [10].

25 En la presente, el trasplante del sustituto de piel se puede realizar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, se puede tratar de un método que comprende una primera etapa de determinación y de eliminación de una zona de piel/dermis a eliminar seguida de una segunda etapa de incorporación del sustituto en la zona que se deja libre. También se puede tratar del método que se describe en el documento E. Dantzer, F. Braye Reconstructive surgery using an artificial dermis (Integra): results with 39 grafts. Br J Plast Surg, 54: 8 8, 2001 [11].

30 En el método de tratamiento, por trastorno de la piel se hace referencia a una quemadura, un defecto de cicatrización relacionado con una herida traumática o con una herida crónica, un trastorno pigmentario, hemangioma y un cáncer cutáneo.

35 Por lo tanto, el método de tratamiento puede permitir la sustitución de una piel herida y/o dañada y/o patológica con un sustituto de la piel sana.

40 El método de tratamiento puede comprender el trasplante del sustituto de piel después de ablación, por ejemplo de un nevus melanocítico, un nevus melanocítico gigante, un melanoma, un hemangioma, un poroma ecino.

El método de tratamiento también puede comprender el implante y/o la aplicación de un sustituto de piel sobre una quemadura y/o una herida profunda y/o una herida crónica, por ejemplo una herida diabética. Estos métodos no forman parte de la invención.

45 La presente invención también tiene como objeto un kit para la realización del método de acuerdo con la invención que comprende un medio M1 de cultivo de fibroblastos, una matriz que comprende colágeno, un medio M2 de cultivo de los fibroblastos en la matriz que comprende colágeno, un medio M3 de cultivo de melanocitos, un medio M4 de cultivo de queratinocitos y un medio M5 de cultivo de piel.

50 La presente invención también tiene como objeto un kit para la realización del método de acuerdo con la invención que comprende un medio M1 de cultivo de fibroblastos, una matriz que comprende colágeno, un medio M2¹, un medio M2² de cultivo de los fibroblastos en la matriz que comprende colágeno, un medio M3 de cultivo de melanocitos, un medio M4 de cultivo de queratinocitos, un medio M5¹ y un medio M5² de cultivo de piel.

55 Los medios M1, M2, M2¹, M2², M3, M4, M5, M5¹ et M5² son tal como se han definido anteriormente.

La presente invención también tiene como objeto un método de injerto de piel que comprende las etapas de:

- toma de una muestra de piel al nivel de una zona no afectada en un individuo,
- 60 - preparación de un sustituto de piel de acuerdo con la invención utilizando los fibroblastos, queratinocitos y fibroblastos obtenidos de la muestra tomada, y
- el injerto del sustituto obtenido en el individuo.

65 Con la lectura de los ejemplos que siguen a continuación, ilustrados con las figuras adjuntas, proporcionadas a modo ilustrativo, todavía podrán aparecer otras ventajas para el experto en la materia.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa un esquema de las etapas que permiten la obtención de un sustituto/equivalente de piel.

La figura 2 representa fotografías en microscopía óptica de piel (figura 2A), de sustitutos de piel obtenidos de acuerdo con el método de la invención con variaciones de proporción de células sembradas (figuras 2B y 2C).

La figura 3A es una fotografía de un sustituto de dermis obtenido a la etapa c en microscopía óptica después de la coloración de los fibroblastos.

La figura 3B es una fotografía de un sustituto de piel obtenido de tamaño pequeño, es decir 0,5 cm².

La figura 3C es una fotografía de un sustituto de piel obtenido de tamaño medio, es decir 25 cm².

La figura 4 representa fotografías después del injerto de una matriz que comprende colágeno (columna A) o de un sustituto de dermis obtenido en la etapa c (columna B) el día del injerto (línea 1), 14 días después del injerto (línea 2) o 24 días después del injerto (línea 3).

La figura 5 representa fotografías en microscopía óptica de una toma de muestra del injerto 24 días después del injerto después de la coloración con hematoxilina-eosina.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ejemplo de fabricación de un sustituto de piel

En el presente ejemplo, las células utilizadas provenían de una biopsia de piel realizada a nivel de mamoplastias realizadas previamente en un paciente.

La toma de muestras de la biopsia fue realizada por un cirujano plástico y la biopsia se depositó en un tubo estéril que contenía suero fisiológico.

A partir de la biopsia, las células se aislaron como sigue a continuación:

1. Aislamiento de las células epiteliales

a. Aclarar la biopsia en HBSS (Solución Salina equilibrada de Hank) estéril

b. Eliminación del tejido adiposo por un técnico biólogo con la ayuda de un escalpelo

c. Incubación con tripsina-EDTA calentada previamente a 37 °C entre 3 y 24 h

d. Neutralización con SVF irradiado (inhibidores de tripsina)

e. Eliminación de la epidermis y raspado con el escalpelo de la capa basal en la que se encuentran las células altamente proliferativas (p63 positivas)

f. Filtración, centrifugación a 1200 vueltas por minuto y siembra del sedimento a 100 000 células por cm² en medio MCDB153 modificados* que comprende los compuestos mencionados en la tabla 4 que sigue a continuación en el que las concentraciones de L arginina, L Histidina, L isoleucina, L leucina, L metionina, L fenil alanina, L treonina, L-triptófano, L tirosina, L marina, Cloruro de Colina se duplicaron, la concentración de NaCl disminuyó a 0,104 M/l, Hepes a 2,29 exp⁻² M/l y NaHCO₃ a 1,19exp⁻² M/l, siendo el pH del medio ajustado a 7,4 y antibióticos (penicilina y estreptomycin al 1 %) para los queratinocitos.

Para los melanocitos, Filtración, centrifugación a 1200 vueltas por minuto y siembra del sedimento a 100 000 células por cm² en medio MCDB153 modificados* que comprende los compuestos mencionados en la tabla 4 que sigue a continuación que comprende además 5,88 g de bicarbonato de sodio/5 l, 0,272 g de tirosina/5 l y 0,157 g de L Metionina/ 5 l, siendo el pH del medio ajustado a 7,4

Tabla 4: composición normal del medio MCDB 153

Composición	Concentración en g.l ⁻¹
Metavanadato de Amonio	0,000000585
Cloruro de Calcio · Anhidro	0,00333
Sulfato Cúprico·5H ₂ O	0,00000275
Sulfato Ferroso·7H ₂ O	0,00139
Cloruro de Magnesio	0,05713
Sulfato de Manganeso	0,000000151
Ácido Molíbdico·4H ₂ O (amonio)	0,00000124
Cloruro de Níquel·6H ₂ O	0,00000012
Cloruro de Potasio	0,11183

ES 2 625 768 T3

Composición	Concentración en g.l ⁻¹
Acetato de Sodio (anhidro)	0,30153
Cloruro de Sodio	7,599
Metasilicato de Sodio·9H ₂ O	0,000142
Fosfato de Sodio Dibásico (anhidro)	0,284088
Selenito de Sodio	0,0000038
Cloruro Estannoso·2H ₂ O	0,000000113
Sulfato de Cinc·7H ₂ O	0,000144
L-Alanina	0,00891
L-Arginina·HCl	0,2107
L-Asparagina·H ₂ O	0,015
Ácido L-Aspártico	0,00399
L-Cisteína·HCl·H ₂ O	0,04204
Ácido L-Glutámico	0,01471
L-Glutamina	0,8772
Glicina	0,00751
L-Histidina·HCl·H ₂ O	0,01677
L-Isoleucina	0,001968
L-Leucina	0,0656
L-Lisina·HCl	0,01827
L-Metionina	0,00448
L-Fenilalanina	0,00496
L-Prolina	0,03453
L-Serina	0,06306
L-Treonina	0,01191
L-Triptófano	0,00306
L-Tirosina·2Na	0,00341
L-Valina	0,03513
D-Biotina	0,0000146
Cloruro de Colina	0,01396
Ácido fólico	0,00079
mio-Inositol	0,01802
Niacinamida	0,00003663
Ácido D-Pantoténico (hemicálcico)	0,000238

Composición	Concentración en g.l ⁻¹
Piridoxina·HCl	0,00006171
Riboflavina	0,0000376
Tiamina·HCl	0,000337
Vitamina B-12	0,000407
Adenina·HCl	0,03088
D-Glucosa	1,081
HEPES	6,6
Rojo Fenol·Na	0,001242
Putrescina·2HCl	0,000161
Ácido Pirúvico·Na	0,055
Ácido Tióctico	0,000206
Timidina	0,000727

g. Incubación a 37 °C a un 5 % de CO₂ durante una semana con cambio del medio los 3 días.

h. Al cabo de una semana aproximadamente: tripsinización diferencial = tripsinización con tripsina al 0,025 % y EDTA 0,1 M (1-2 minutos para separar los melanocitos, 10 minutos para separar los queratinocitos). Los melanocitos se separan en primer lugar, lo que permite purificar los cultivos.

Neutralización con SVF irradiado, centrifugación a 1200 vueltas por minuto y siembra del sedimento para amplificación en el mismo medio.

i. Incubación a 37 °C a un 5 % de CO₂ durante una semana con cambio del medio los 3 días.

10 2. Aislamiento de los fibroblastos

a. Aclarado de la parte dérmica con HBSS,

b. Incubación de la dermis con colagenasa al 1 % a 37 °C como máximo 3 horas de acuerdo con el tipo de dermis.

c. Neutralización con SVF irradiado.

d. Filtración a través de un tamiz celular de 40 µm, centrifugación a 1200 vueltas por minuto con una centrifugadora GR 2022 durante unos cinco minutos y siembra del sedimento a 100 000 células por cm² en DMEM que comprende SVF al 10 % irradiado y penicilina y estreptomomicina al 1 % durante 24 horas.

e. Incubación en una incubadora Jouan IG 150 a 37 °C con CO₂ al 5 % durante una semana con cambio del medio los 3 días.

3. Preparación de un sustituto de piel

a. Tripsinización de los fibroblastos con tripsina al 0,025 % y EDTA 0,1 M durante 10 minutos y a continuación neutralización con SVF irradiado, centrifugación a 1200 vueltas por minuto con una centrifugadora GR 2022 durante 5 minutos, y siembra en DMEM que comprende SVF al 10 % sobre una matriz térmica de origen de colágeno estéril, es decir, una matriz Integra (marca registrada) aclarada previamente con una solución salina equilibrada de Hank (« Solución Salina equilibrada de Hank » (HBSS) 3 veces a razón de 30 000 fibroblastos por cm² en una cámara de incubación de acero inoxidable realizada a medida.

b. Al cabo de 24 horas de cultivo a 37 °C, CO₂ al 5 %, la cámara de incubación se retiró de la matriz.

c. La matriz sembrada se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % en DMEM que comprendía un 10 % de SVF irradiado y penicilina y estreptomomicina al 1 % y ácido ascórbico 50 mg/ml, durante 1 semana con cambio del medio los 3 días.

d. Tripsinización de los queratinocitos y de los melanocitos con tripsina al 0,025 % y EDTA 0,1 M durante 1 a 2 minutos para separar los melanocitos de las placas de cultivo de melanocitos, durante 10 minutos para separar los queratinocitos de las placas de cultivo de queratinocitos. Neutralización con SVF y radial y centrifugación y siembra a 400 000 células por cm² en una cámara de incubación de una mezcla que contiene 1 melanocito por 19 queratinocitos.

e. Adhesión durante 24 horas.

f. Submersión durante 7 días en medio de Green modificado :DMEM / F12 de Ham / SVF al 10 % que comprende ácido hialurónico a 50 mg/ml.

g. Superficie de contacto durante 7 días en medio de Green modificado DMEM / F12 de Ham que comprende SVF al 10 %, ácido hialurónico a 50 mg/ml y ácido ascórbico 50 mg/ml y antibióticos, es decir penicilina y estreptomycin al 1 %.

5 La figura 1 representa un esquema de las etapas que permiten la obtención de un sustituto de piel.

En el presente ejemplo, dos sustitutos de piel obtenidos presentaban proporciones (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 13,3. Para la proporción de 13,3, durante las etapas de depósito de los fibroblastos y de la mezcla de queratinocitos/melanocitos las cantidades de células sembradas eran respectivamente 10 000 para los fibroblastos, 10 000 para los melanocitos y 190 000 para los queratinocitos.

Una vez obtenido el sustituto, se fijó en formol al 4 %, se introdujo en parafina y a continuación se realizó un corte de 4 µm en, a continuación se realizó una coloración con hematoxilina-eosina con el fin de marcar las diferentes capas de la piel. Se realizó una observación al microscopio óptico con un aumento de 40x. Con el microscopio acoplado a una cámara CCD (Nikon, software NIS elemento Br) se realizaron fotografías de las observaciones. La figura 2B representa una fotografía en microscopía óptica de un sustituto de piel obtenido de acuerdo con el método en el que la proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos era de 13,3. La figura 2C representa una fotografía en microscopía óptica de un sustituto de piel obtenido de acuerdo con el método en el que la proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos era de 6,7 y la figura 2A una fotografía en microscopía óptica de una biopsia de piel normal. Tal como se representa en estas fotografías, el sustituto obtenido con el método tiene una estructura idéntica que comprende una estructura idéntica a la de la piel *in vivo*.

Ejemplo 2: Injerto de un sustituto de dermis de acuerdo con la invención en ratones

25 En este ejemplo, el sustituto de piel utilizado era el sustituto obtenido como se ha descrito en el ejemplo 1 con células obtenidas a partir de mamoplastias con la proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 13, 3. Los ratones utilizados eran ratones atímicos Swiww nu/nu que provenían de Jackson Lab.

30 En este ejemplo, se realizaron injertos en 10 ratones en paralelo.

Una incisión en los ratones se realizó con la ayuda de un escalpelo en una zona de 5 cm² con el fin de suprimir la dermis y la epidermis, se realizó una limpieza de la zona escarificada con suero fisiológico. Un sustituto de piel preparado previamente se aplicó sobre la zona escarificada con el fin de recubrirla (figura 4A, línea 1) y a continuación la zona insertada se cerró con la piel del ratón que se suturó (figura 4B, línea 1).

35 Los ratones se conservaron en un animalario especializado de manera individual por jaula durante el periodo de tiempo en el que injerto prende y a continuación a razón de 5 en jaulas de tamaño adecuado.

40 Después de 2 semanas, se realizó una observación de cómo había aprendido el injerto retirando la tapa de piel del ratón (figura 4A, línea 2). En otras palabras, la piel suturada del ratón se desuturó, se eliminó y el sustituto de dermis injertado se actualizó para una observación visual (figura 4B, línea 2).

45 Después de 3 semanas, se realizó una observación visual de cómo había aprendido el injerto (figuras 4B y B, línea 3).

Tal como se demuestra en la figura 4, parece claramente que el sustituto de dermis se puede aplicar de manera ventajosa, en particular para un injerto sin inducción de efectos secundarios.

50 Además, con el fin de estudiar el estado estructural del sustituto de dermis después de tres semanas después de la aplicación, se realizó una toma de muestra mediante corte del sustituto con el escalpelo. El sustituto se fijó en formol al 4 %, se incluyó en parafina y a continuación se realizó un corte de 4 µm, a continuación se realizó una coloración con hematoxilina-eosina con el fin de marcar las diferentes capas de la piel. Se realizó una observación con el microscopio óptico con un aumento de 40x. Con el microscopio acoplado a una cámara CCD (Nikon, software NIS elemento Br) se realizaron fotografías de las observaciones.

55 La figura 5 representada fotografías en microscopía óptica de los sustitutos injertados. En particular, la figura 5A, muestra el sustituto colonizado por los fibroblastos murinos que son poco numerosos y que no han comenzado a remodelar el colágeno. La figura 5B muestra sustituto colonizado con los fibroblastos humanos antes del injerto. Se observa un número importante de fibroblastos y una remodelación de la matriz en particular en la zona superficial con manojos más espesos de colágeno. Por lo tanto, el presente ejemplo demuestra claramente que la presencia del conjunto de las células permite la obtención de un sustituto fácilmente integrable, que no se degrada con el tiempo y que presenta una maduración después del injerto, que se acelera en presencia de fibroblastos en la matriz.

60

Listado de referencias

1. Pendaries V *et al.*, siRNA-mediated allele-specific inhibition of mutant type VII collagen in dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *JID* 2012, Jun; 132 (6): 1741-3.
- 5 2. Petek LM *et al.*, "Efficient KRT14 targeting and functional characterization of transplanted human keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa simplex". *Mol ther* 2010, Sep; 18 (9): 1624-32.
3. Kogut *et al.*, "Differentiation of human induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage" *Methods Mol Biol* 2014, 1195: 1-12.
- 10 4. Ohta *et al.*, "Génération of human melanocytes from induced pluripotent stem cells" *Methods Mol Biol*, 2013; 989: 193-215.
5. Revilla *et al.*, "Current advances in the génération of human iPS cells: implications in cell-based regenerative medicine." *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, Mar 11.
6. Bell *et al.*, 1979.
- 15 7. Boyce ST *et al.*, "Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes", 1988 Oct; 22 (10): 939-57.
8. Hafemann *et al.*, "Use of a collagen/elastin-membrane for the tissue engineering of dermis." *Burns* 1999, Agosto; 25 (5): 373-84.
9. Wonhye Lee *et al.*, "Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication." *Biomaterials*, 2009, Mar; 30 (8): 1587-95.
- 20 10. Pena, *et al.*, *J Oral and Maxillofacial Surgery*, 70: 10 10, 2012.
11. E. Dantzer, F. Braye "Reconstructive surgery using an artificial dermis (Integra): results with 39 grafts." *Br J Plast Surg*, 54: 8 8, 2001.

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de un sustituto de piel que comprende las siguientes etapas:

- 5 a. cultivo de fibroblastos en un medio M1 de cultivo de fibroblastos;
- b. siembra de una matriz que comprende colágeno con fibroblastos obtenidos en la etapa a;
- c. cultivo de los fibroblastos sembrados en la matriz que comprende colágeno en un medio M2 de cultivo de fibroblastos, formando la matriz y los fibroblastos cultivados un sustituto de dermis;
- 10 d. cultivo de melanocitos en un medio M3 de cultivo de melanocitos;
- e. cultivo de queratinocitos en un medio M4 de cultivo de queratinocitos;
- f. mezcla de melanocitos obtenidos en la etapa d con queratinocitos obtenidos en la etapa e;
- g. siembra del sustituto de dermis obtenido en la etapa c con la mezcla obtenida en la etapa f;
- h. cultivo del sustituto de dermis sembrado en la etapa g en un medio M5 de cultivo de piel formando de ese modo el sustituto de piel.

15 en el que el medio M2 comprende ácido ascórbico o un ascorbato, el medio M5 comprende ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos, y la siembra en la etapa g se realiza con una proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 9 a 19.

20 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio M5 comprende ácido ascórbico o un ascorbato.

3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la mezcla de melanocitos y de queratinocitos de la etapa f se realiza con una proporción de melanocitos / queratinocitos de 1/20 a 1/15.

25 4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la siembra en la etapa b se realiza a una densidad de 20 000 a 50 000 fibroblastos / cm² de superficie de la matriz que comprende colágeno.

5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa c. comprende una primera etapa c' de cultivo de 18 a 28 horas en presencia de un medio M2¹ de cultivo de fibroblastos que no comprende ni ácido ascórbico ni ascorbato, una segunda etapa c" de cultivo de al menos 2 días en presencia de un medio M2² de cultivo de fibroblastos que comprende ácido ascórbico o un ascorbato.

30 6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la etapa h. comprende:

- 35 - una primera etapa h.' de cultivo de 6 a 24 horas en presencia de un medio M5¹ de cultivo que no comprende ni ácido hialurónico, ni hialuronato, ni ácido ascórbico ni ascorbato,
- una segunda etapa h." de cultivo de al menos 2 días en presencia de un medio M5² de cultivo que comprende ácido hialurónico o un hialuronato y
- 40 - una tercera etapa h.'" de cultivo de al menos 2 días en un medio M5³ que comprende ácido hialurónico o un hialuronato y ácido ascórbico o un ascorbato.

7. Sustituto de piel obtenido mediante la realización del método definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

45 8. Sustituto de piel de acuerdo con la reivindicación 7, en el que los fibroblastos son autólogos de un individuo con fines de un injerto de dicho sustituto de piel sobre dicho individuo.

9. Sustituto de piel de acuerdo con la reivindicación 8, en el que los fibroblastos, los melanocitos y queratinocitos son autólogos de un individuo.

50 10. Injerto constituido por un sustituto de piel de acuerdo con la reivindicación 8 o 9.

11. Injerto de acuerdo con la reivindicación 10 para una utilización como medio de tratamiento de un trastorno cutáneo y/o de una pérdida de sustancia cutánea.

55 12. Injerto para una utilización de acuerdo con la reivindicación 11 en el que el trastorno cutáneo y/o una pérdida de sustancia cutánea se elige entre el grupo que comprende una quemadura, un defecto de cicatrización, una herida crónica, un trastorno pigmentario, un hemangioma y un cáncer cutáneo.

60 13. Kit para la realización del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende un medio M1 de cultivo de fibroblastos, una matriz que comprende colágeno, un medio M2 de cultivo de fibroblastos en la matriz que comprende colágeno, un medio M3 de cultivo de melanocitos, un medio M4 de cultivo de queratinocitos y un medio M5 de cultivo de piel, en el que el medio M2 comprende ácido ascórbico o un ascorbato y el medio M5 comprende ácido hialurónico o un hialuronato.

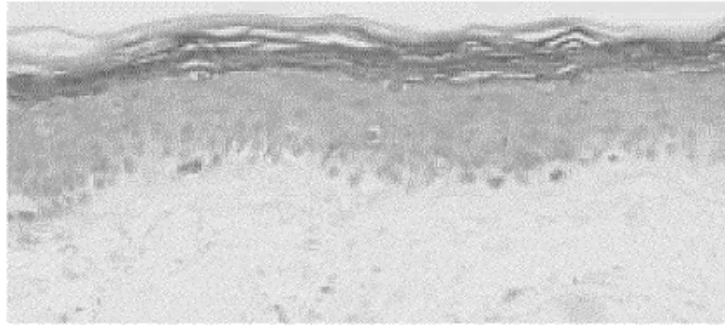
65

14. Kit de acuerdo con la reivindicación 13 en el que los medios M1 a M5 son independientemente medios de calidad clínica.

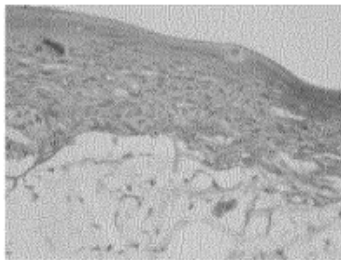


FIGURA 1

A



B



C

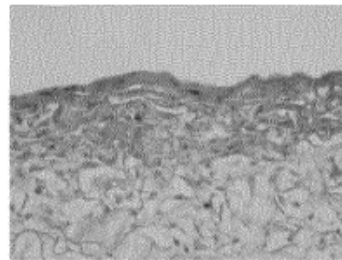


FIGURA 2

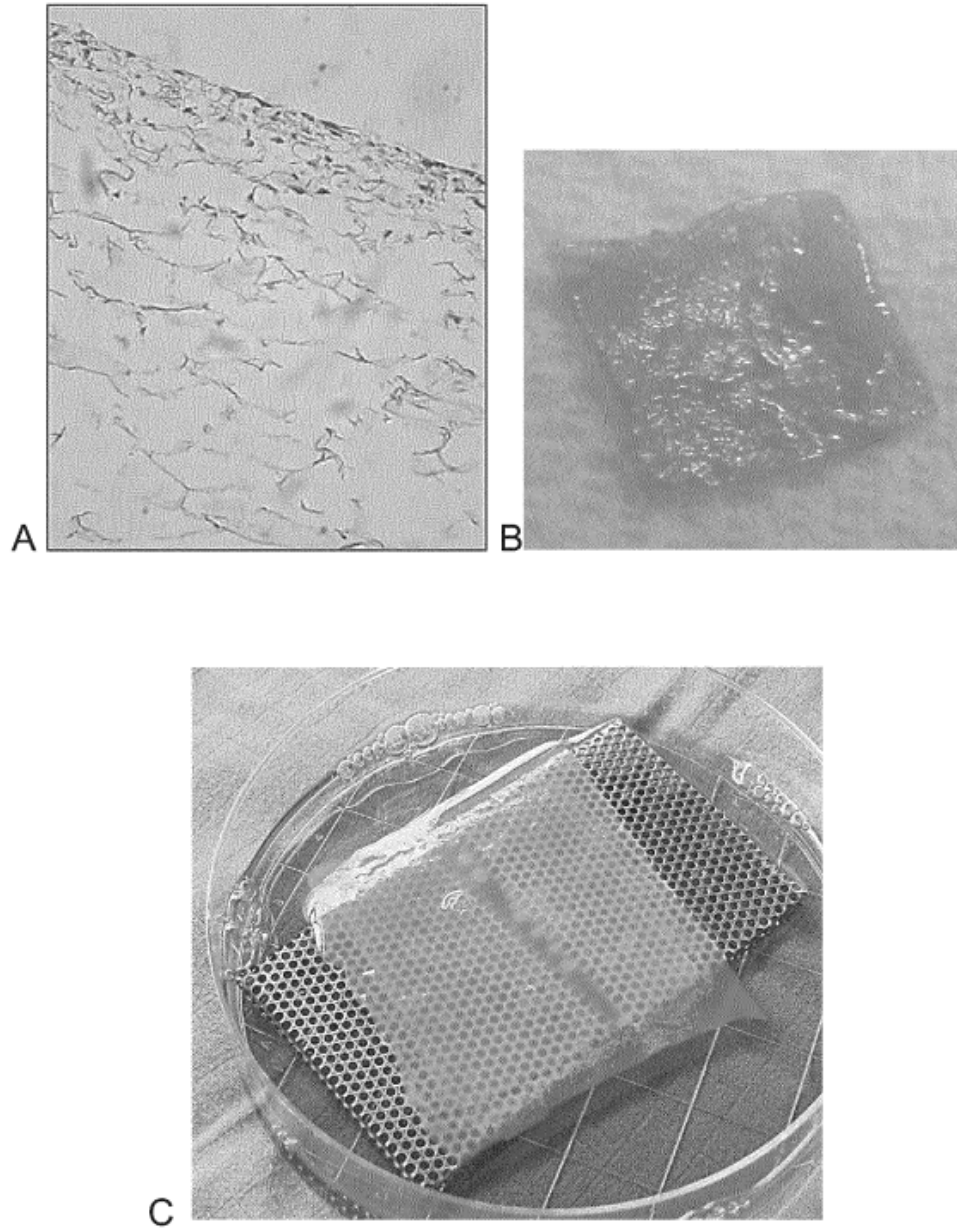


FIGURA 3

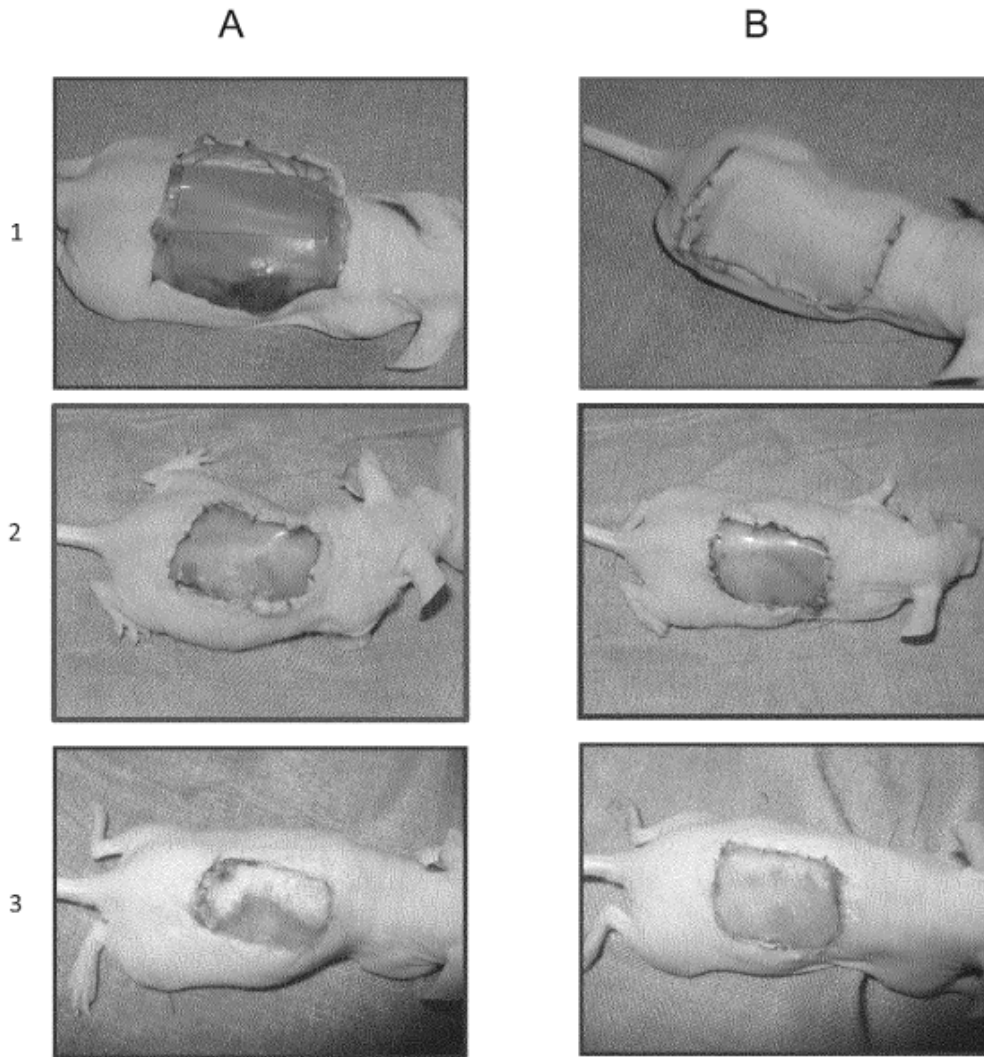


FIGURA 4

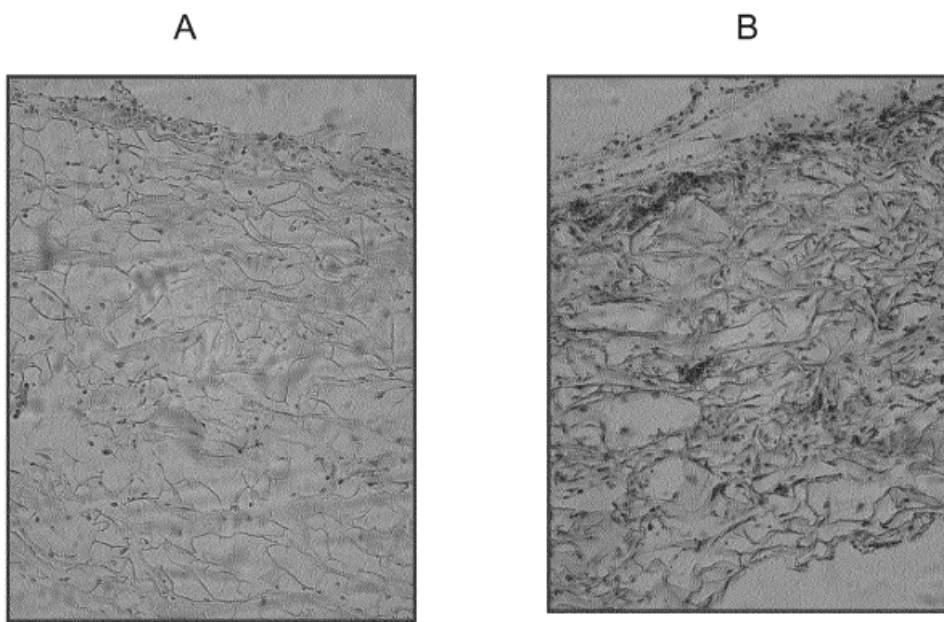


FIGURA 5