

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 700**

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

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2016 PCT/EP2016/056700**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16151133**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2016 E 16713834 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3274005**

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

30 Prioridad:

26.03.2015 EP 15305441

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

08.07.2020

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (33.3%)

35 Place Pey Berland

33000 Bordeaux, FR;

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:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 772 700 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 para preparar un sustituto de piel, sustituto de piel animal, preferentemente de mamífero y/o humano, susceptible de obtención al usar el método y a un kit para realizar el método.

10 La presente invención también se refiere a un injerto que consiste en un sustituto de piel y su uso como medio para tratar un trastorno cutáneo y/o una pérdida de sustancia cutánea.

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

En la descripción a continuación, las referencias entre corchetes ([]) se refieren al listado de referencias presentado al final del texto.

20 Estado de la técnica

La piel es un órgano muy complejo con una estructura en capas muy específica. Comprende tres partes principales:

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

30 Proporciona especialmente una barrera entre los medios externos y el medio interno de muchos mamíferos, incluyendo al ser humano en particular. Debido a esta función de "barrera", la piel protege naturalmente al organismo al tiempo que garantiza la comunicación entre este y el medio externo. La piel es el primer órgano de defensa contra cualquier agresión.

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

40 De hecho, se sabe que los productos químicos y/o moléculas como hidroquinona, cuando se usan en grandes dosis puede inducir una fuerte despigmentación, provocar cicatrices, estrías, patologías graves, por ejemplo diabetes, hipertensión, cánceres cutáneos o complicaciones sistémicas, trastornos renales, desarrollo de vello y crecimiento de la barba y alteración del olor corporal. Cuando la decoloración va más allá del efecto deseado, estas consecuencias pueden ser irreversibles. La solución principal sigue siendo el injerto de piel para intentar "recuperar" una apariencia normal.

45 Otros elementos pueden ser el origen de una alteración cutánea, por ejemplo, parámetros de naturaleza genética y/o relacionados con trastornos endocrinos y/o autoinmunes sistémicos. Especialmente pueden ser patologías que provocan un trastorno pigmentario como vitiligo, hipermelanosis, hipomelanosis o un nevus. Uno de los métodos para tratar tales trastornos comprende el injerto de piel y/o el implante de células pigmentarias. No obstante, Estos métodos tienen eficacia es relativas relacionadas a menudo con la estabilidad de las pieles y/o células de pigmentarias aplicadas.

50 La piel también puede lesionarse, por ejemplo por elementos externos como objetos contundentes, provocando heridas más o menos profundas. La piel presenta capacidades de regeneración y cicatrización muy importantes permitiendo, la mayor parte del tiempo, una cicatrización más o menos a largo plazo. El tiempo y/o la capacidad cicatrización pueden depender en particular de la profundidad/extensión de la herida y también del estado fisiológico del individuo. En efecto, en el caso de heridas profundas, estas pueden representar "puertas abiertas" a los patógenos necesitando una mayor vigilancia y/o la necesidad de intervención para cerrar la herida, por ejemplo con puntos de sutura o aplicando un injerto de piel en particular para permitir que la piel se regenere, en particular para reparar las

55 La piel también puede lesionarse, por ejemplo por elementos externos como objetos contundentes, provocando heridas más o menos profundas. La piel presenta capacidades de regeneración y cicatrización muy importantes permitiendo, la mayor parte del tiempo, una cicatrización más o menos a largo plazo. El tiempo y/o la capacidad cicatrización pueden depender en particular de la profundidad/extensión de la herida y también del estado fisiológico del individuo. En efecto, en el caso de heridas profundas, estas pueden representar "puertas abiertas" a los patógenos necesitando una mayor vigilancia y/o la necesidad de intervención para cerrar la herida, por ejemplo con puntos de sutura o aplicando un injerto de piel en particular para permitir que la piel se regenere, en particular para reparar las

60 En el estado de la técnica existen sustitutos artificiales de la dermis que permiten, en particular temporalmente, la formación de un entorno favorable para la regeneración de la piel. La estructura y el entorno formado por estos sustitutos a menudo son similares a los de la dermis. No obstante, estos sustitutos son dispositivos médicos, esencialmente sintéticos y caros.

65 En el estado de la técnica existen sustitutos artificiales de la dermis que permiten, en particular temporalmente, la formación de un entorno favorable para la regeneración de la piel. La estructura y el entorno formado por estos sustitutos a menudo son similares a los de la dermis. No obstante, estos sustitutos son dispositivos médicos, esencialmente sintéticos y caros.

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

5 No obstante, estos métodos y sustitutos no constituyen más que tales sustitutos de piel que comprenden la mayoría de las células constitutivas de la piel, como fibroblastos, queratinocitos y melanocitos. En particular, estos sustitutos no incluyen melanocitos y, por tanto, no permiten obtener sustitutos de piel pigmentados y/o susceptibles de ser pigmentados. Además, estos sustitutos no pueden usarse, por ejemplo, para el tratamiento de trastornos pigmentarios, tratamiento de heridas profundas, por ejemplo debido a intervenciones quirúrgicas, accidentes que provocan, por ejemplo, una pérdida significativa de piel que pueden variar hasta la pérdida total de piel.

10 Por otro lado, los métodos para obtener los sustitutos de dermis disponibles son métodos "lentos" que no permiten, por ejemplo, obtener sustitutos dentro de los plazos compatibles para el tratamiento de heridas particulares como quemaduras profundas.

15 Finalmente, la mayoría de los sustitutos de piel disponibles en el mercado son productos frágiles, tanto estructural como epidemiológicamente. También, estos productos a menudo son pequeños, para, en particular, evitar cualquier desgarro del producto durante su manipulación.

20 En el estado de la técnica también existen sistemas/métodos para preparar sustitutos de piel, por ejemplo, como se describe en el documento US 5 755 814 que comprende en particular el cultivo de células, en particular fibroblastos, y/o una mezcla de melanocitos y queratinocitos. No obstante, estos sistemas/métodos no permiten obtener un sustituto con una estructura idéntica a la de la piel *in vivo*. Asimismo, los sustitutos obtenidos con estos métodos tienen paraqueratosis, anomalía de diferenciación de la piel, correspondiente a una maduración anómala de la queratina a nivel del estrato córneo, no permitiendo por tanto sus usos en el tratamiento de trastornos cutáneos y/o pérdidas de sustancia cutánea. Finalmente, los sistemas/métodos para preparar el uso de sustitutos de piel conocidos usan en particular medios que comprenden compuestos incompatibles con el uso clínico, por ejemplo extracto pituitario bovino.

25 Por lo tanto, existe una necesidad real de encontrar un método para preparar un sustituto de piel que supere estos defectos, desventajas y obstáculos de la técnica anterior, en particular, un método que permita obtener un sustituto de piel que comprenda la mayoría de las células que constituyen la piel, especialmente fibroblastos, queratinocitos y melanocitos, para reducir los costes y el tiempo de preparación del sustituto.

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

35 También existe una necesidad real de encontrar un nuevo sustituto de piel que se pueda utilizar para el tratamiento de trastornos de la piel y/o pérdida de sustancias cutáneas.

40 Todavía existe una necesidad real de encontrar un nuevo sustituto de piel que sea fácil de manejar y que no presente un alto riesgo de desgarro durante su manipulación.

45 Descripción de la invención

La finalidad de la presente invención es precisamente satisfacer esta necesidad proporcionando un método para la preparación de un sustituto de piel que comprende las siguientes etapas:

- a. cultivar fibroblastos en un medio M1 de cultivo de fibroblastos;
- 50 b. sembrar una matriz que contiene colágeno con fibroblastos obtenidos en la etapa a;
- c. cultivar fibroblastos sembrados en la matriz que contiene colágeno en un medio M2 de cultivo de fibroblastos que contiene ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos, la matriz y los fibroblastos cultivados formando un sustituto de dermis;
- d. cultivar melanocitos en un medio M3 de cultivo de melanocitos;
- 55 e. cultivar queratinocitos en un medio M4 de cultivo de queratinocitos;
- f. mezclar melanocitos obtenidos en la etapa d con queratinocitos obtenidos en la etapa e;
- g. sembrar el sustituto de dermis obtenido en la etapa c con la mezcla obtenida en la etapa f; en donde la siembra en la etapa g se realiza con una relación (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 9 a 19, y
- 60 h. cultivar el sustituto de dermis sembrado en la etapa g en un medio M5 de cultivo de piel formando así el sustituto de piel.

En la presente, el término "comprender" puede significar igualmente "incluir", "contener" o "abarcar", por una parte, "constituirse de" o "consistir en" por otra parte.

65 En la presente, el sustituto de dermis obtenido según 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 colágeno, glicosaminoglicanos, proteínas y fibroblastos funcionales.

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

Ventajosamente, el método según la invención permite obtener un sustituto de piel que comprende una lámina basal constituida en particular por una mezcla proteica secretada por las células del sustituto formando así una unión dermoepidérmica que reproduce las características de una piel *in vivo*.

En la presente, los fibroblastos, melanocitos, queratinocitos susceptibles de uso en el método de la invención pueden ser todos fibroblastos, melanocitos, queratinocitos conocidos por el experto en la materia. Pueden ser, por ejemplo, fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos obtenidos de bancos de células, por ejemplo de la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 PARÍS Cedex 15. También pueden ser fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos disponibles comercialmente, por ejemplo las células comercializadas por la compañía científica Thermofischer, la compañía CellnTec o la compañía Promocell. También pueden ser fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos aislados de una muestra biológica de un animal, preferentemente un mamífero y/o un ser humano, previamente aislado. Los fibroblastos, los melanocitos y/o queratinocitos pueden ser fibroblastos, melanocitos, queratinocitos aislados independientemente de una biopsia o varias biopsias. Los fibroblastos, los melanocitos y/o queratinocitos pueden aislarse independientemente de una biopsia o varias biopsias de un individuo, preferentemente un mamífero y/o un ser humano, para un trasplante de dicho sustituto de piel en dicho paciente. Pueden ser independientemente fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos autólogos o heterólogos de un individuo.

En la presente, ventajosamente al menos dos tipos de células entre los tres tipos de células representados por fibroblastos, melanocitos y queratinocitos son autólogos de un individuo.

En una realización particular, los fibroblastos, melanocitos y queratinocitos son ventajosamente células autólogas de un individuo.

Los fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos pueden aislarse independientemente de una biopsia o varias biopsias de, por ejemplo una piel caucásica, asiática o africana, de diferentes sitios anatómicos, por ejemplo de la espalda, cara, mama, dorso de las manos, palmas de un ser humano.

Pueden ser independientemente fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos aislados independientemente de biopsias de piel, preferentemente de un ser humano, que presenta una o más patologías cutáneas, por ejemplo manchas de edad (léntigo actínico), melasma, vitíligo, nevus o melanoma.

También pueden ser fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos modificados genéticamente de forma independiente, por ejemplo con retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adeno asociado (AAV). Pueden ser, por ejemplo, fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos que sobreexpresan independientemente al menos una proteína, por ejemplo una proteína elegida entre colágeno VII, queratinas 5, 14, catalasa, SIRT6 y/o que subexpresan al menos una proteína, por ejemplo, mediante la técnica de pequeños ARN horquillados (ARNsh) o pequeños ARN la interferencia (ARNsi), por ejemplo colágeno VII, HIF1, CCN3. Pueden ser, por ejemplo, fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos modificados genéticamente independientemente como se describe en Pendaries V *et al.*, JID 2012 [1]; Petek LM *et al* Mol ther 2010 [2]. Pueden ser, por ejemplo, fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos independientemente modificados genéticamente o no, por ejemplo, la célula Ker-CT identificada con la referencia ATCC CRL-4048, la célula TelCOFS02MA identificada con la referencia ATCC CRL-4005.

También pueden ser fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos de línea celular, por ejemplo la línea queratinocítica HaCaT, la línea fibroblástica WS1.

Preferentemente, los fibroblastos susceptibles de uso no incluyen fibroblastos irradiados 3T3.

También pueden ser fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos obtenidos independientemente de células madre adultas, células madre pluripotentes inducidas, por ejemplo, manteniendo dichas células madre adultas y/o células madre pluripotentes inducidas mediante, por ejemplo, la introducción de genes Oct3/4, Sox 2, KLF4, c-Myc luego diferenciadas por cócteles factoriales, por ejemplo ácido retinoico y/o BMP-4, en una línea celular. También pueden ser células madre adultas y/o células madre pluripotentes inducidas por técnicas no virales basadas en el uso de nanopartículas, por ejemplo nanopartículas de poliamidoamina terminadas en arginina. El experto en la materia, en virtud de su conocimiento general, sabrá cómo elegir el método y/o las células. Pueden ser, por ejemplo, fibroblastos, melanocitos y/o queratinocitos obtenidos con el método descrito 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 invención, por medio M1 de cultivo de fibroblastos se entiende cualquier medio conocido por los expertos en la materia adecuado para el cultivo de fibroblastos. Por ejemplo puede ser un medio disponible comercialmente, por ejemplo, un medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) comercializado por la compañía Gibco, que comprende en particular una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, azúcares, por ejemplo glucosa, o medio Fibrolife comercializado por la compañía Cell Systems.

Tabla 1: Composición del medio mínimo esencial de Eagle modificado por 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-isoileucina	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
D-pantotenato cálcico	4
Ácido fólico	4
Niacinamida	4
Clorhidrato de piridoxina	4
Riboflavina	0,4
Clorhidrato de tiamina	4
i-Inositol	7,2
Sales inorgánicas	
Cloruro cálcico (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 potásico (KCl)	400
Bicarbonato sódico (NaHCO ₃)	3700
Cloruro sódico (NaCl)	6400
Fosfato sódico monobásico (NaH ₂ PO ₄ -2h ₂ O)	141
Otros compuestos	
D-Glucosa (Dextrosa)	1000
Piruvato sódico	110

En la presente, el medio M1 también puede incluir suplementos, incluyendo suero de ternera fetal (SVF).

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

En la presente, el medio M1 puede comprender al menos un compuesto antifúngico y/o antibiótico. Puede ser, por ejemplo, cualquier compuesto antimicótico y/o antibiótico conocido por un experto en la materia y/o disponible comercialmente. Puede ser, por ejemplo, al menos un compuesto antifúngico elegido del grupo que comprende Anfotericina B, ketoconazol y una mezcla de los mismos. Por ejemplo, puede ser al menos un compuesto antibiótico elegido del grupo que comprende penicilina, estreptomina, ciprofloxacina y una mezcla de los mismos.

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

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

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

Por "calidad clínica" se entiende en la presente que el componente o medio ha sido reconocido por la autoridad competente como adecuado para uso clínico en un territorio dado. Ventajosamente en la presente, cuando el medio es de calidad clínica no incluye extracto de pituitaria bovina.

5 En la presente, la etapa a. de cultivo de fibroblastos se puede realizar a una temperatura 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, 8 a 15 días.

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

15 Según la invención, la etapa a. de cultivo de fibroblastos puede realizarse en un horno 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 5 % de CO₂.

20 Según la invención, la etapa a. de cultivo de fibroblastos se puede realizar en cualquier recipiente de cultivo adecuado conocido por el experto en la materia. Puede ser una placa de Petri, un matraz de cultivo con una capacidad de 25 a 75 cm², 25, 75 o 175 cm².

Según la invención, los fibroblastos obtenidos por cultivo según la etapa a. pueden formar un tapiz celular de confluencia en el recipiente de cultivo. Por ejemplo, los fibroblastos pueden tener una confluencia de 70 a 100 %, preferentemente al 100 % de confluencia.

25 Según la invención, cuando el cultivo según la etapa a. corresponde a un tapiz celular en confluencia o no, el método también puede comprender:

- 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 curado o centrifugación.

35 Según la invención, en la etapa a', la eliminación del medio de cultivo puede realizarse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, una aspiración del medio, un volteo del contenedor para eliminar el medio de cultivo.

Según la invención, en la etapa a', las células se pueden aclarar mediante cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, inmersión, aspersión, incubación de las células en una solución de aclarado.

40 En la presente, por solución de aclarado se entiende cualquier solución de aclarado celular conocida por el experto en la materia. Por ejemplo, puede ser una solución tampón HBSS (solución salina equilibrada de Hank) con un pH de 7,2 a 7,4.

Tabla 2: composición del medio HBSS

Compuestos	Peso molecular g/mol	Concentración (mg/l)	mM
Sales inorgánicas			
Cloruro potásico	75	400	5,333335
Fosfato potásico monobásico (KH ₂ PO ₄)	136	60	0,4411
Bicarbonato sódico	84	350	4,16
Cloruro sódico	58	8000	137,93
Sales inorgánicas			
Fosfato sódico 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

45 También puede ser una solución tampón disponible comercialmente, por ejemplo una solución salina tamponada con fosfato (PBS), una solución equilibrada de Hank's comercializada respectivamente por la compañía Gibco, Sigma Aldrich, Lonza.

50 Según la invención, en la etapa a', la eliminación de la solución de aclarado puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, puede ser una aspiración de la solución de aclarado, volteo del recipiente para eliminar la solución de aclarado.

Según la invención, La etapa a" de tripsinización puede realizarse sumergiendo las células en una solución tampón

(ST) que comprende tripsina, seguido de adición de suero fetal de ternera (SVF) para detener la reacción enzimática.

5 Según la invención, la solución tampón (ST) puede ser cualquier solución tampón conocida por el experto en la materia susceptible de uso en un método de tripsinización. Puede ser, por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato (PBS), una solución equilibrada de Hank's comercializada respectivamente por la compañía Gibco, Sigma Aldrich, Lonza.

10 Según la invención, la cantidad de tripsina añadida a la solución tampón (ST) puede estar entre 0,01 y 0,05 % en peso con respecto al peso total.

Según la invención, el tiempo de incubación en la solución tampón que comprende tripsina antes de añadir SVF a la solución tampón (ST) puede ser entre 2 y 10 min.

15 Según la invención, la cantidad de SVF añadido a la solución tampón (ST) puede estar entre 5 y 20 % en volumen con respecto al volumen total.

20 Según la invención, la etapa a''' de curado puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, sedimentación o centrifugación a una velocidad de 800 a 1400 rpm, por ejemplo igual a 1200 rpm.

Según la invención, la etapa a''' de centrifugación puede realizarse durante un periodo de 4 a 10 min, por ejemplo igual a 5 minutos.

25 Según la invención, la etapa a''' de curado puede realizarse mediante cualquier dispositivo conocido por los expertos en la materia. Puede ser, por ejemplo, una centrifugadora giratoria comercializada por las compañías Eppendorf o Jouan.

30 En la presente, "matriz que contiene colágeno" significa cualquier matriz que contiene colágeno conocida por el experto en la materia susceptible de siembra por células. Puede, por ejemplo, ser una matriz de colágeno correspondiente a un gel de colágeno tipo I no estirado, preferentemente no imponiendo organización preferente de fibroblastos como se describe en Bell *et al.*, 1979 [6]. Puede ser, por ejemplo, una matriz con una densidad/concentración de colágeno, preferentemente colágeno de tipo I, con una superficie de 25 a 500 cm². Puede ser, por ejemplo, una matriz que contiene colágeno disponible comercialmente, por ejemplo, puede ser una matriz que contiene colágeno comercializada por la compañía Integra.

35 Ventajosamente, la matriz que contiene colágeno puede ser una matriz de regeneración dérmica. La matriz de regeneración dérmica se puede elegir en particular entre las matrices comercializadas con los nombres Integra (marca registrada) y Matriderm (marca registrada) por las compañías Intégra Life Science Corporation y MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG respectivamente. Ventajosamente, y a diferencia de las otras matrices que comprenden colágeno, las matrices de regeneración dérmica como las mencionadas anteriormente ya están modeladas, favoreciendo la reconstrucción del equivalente de piel.

40 En una realización, la matriz que contiene colágeno puede ser una matriz que contiene colágeno reticulado y al menos un glicosaminoglicano, por ejemplo 6-sulfato de condroitina. Puede ser, por ejemplo, la matriz Integra (marca registrada) comercializada por la compañía Integralife Sciences y/o la matriz obtenida según el método descrito en el documento Boyce ST *et al* 1988 [7].

45 En otra forma de realización, la matriz que contiene colágeno puede ser una matriz que comprende fibras de colágeno de estructura nativa y elastina. Por fibras de colágeno de estructura nativa se entiende en particular fibras que no están reticuladas químicamente. Puede ser, por ejemplo, la matriz Matriderm comercializada por la compañía MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG y/o la matriz obtenida según el método descrito en el documento Hafemann *et al.*, Burns 1999 [8].

50 En la presente, el grosor de la matriz que contiene colágeno puede ser de 1,0 a 3,0 mm (límites incluidos) antes de la siembra con fibroblastos. En una realización particular, el grosor de la matriz que contiene colágeno puede ser estrictamente superior a 1,0 mm antes de la siembra con fibroblastos.

55 En la presente, la siembra de la etapa b puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, una aplicación, por ejemplo por aspersión un medio de cultivo que comprende los fibroblastos en la matriz, deposición trasplantando las células en la matriz, vertido un medio de cultivo que comprende las células en suspensión, impresión 3D, por ejemplo, como se describe en Wonhye Lee *et al.* "Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication". Biomaterials, 2009, marzo; 30(8):1587-95 [7].

60 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.

ES 2 772 700 T3

5 En la presente, la siembra de la etapa b de una matriz que contiene colágeno puede realizarse a una densidad de 20.000 a 50.000 fibroblastos/cm², preferentemente 30.000 fibroblastos/cm² de superficie de la matriz comprendiendo colágeno. En una realización particular, la densidad de los fibroblastos puede ser estrictamente inferior a 50.000 fibroblastos/cm² de matriz que contiene colágeno.

10 En la presente, el medio M2 de cultivo de fibroblastos puede ser cualquier medio conocido por el experto en la materia adecuado para el cultivo de fibroblastos. Por ejemplo puede ser un medio disponible comercialmente, por ejemplo, un medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que comprende en particular una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas de azúcares, por ejemplo glucosa.

En la presente, el medio M1 también puede incluir suplementos, incluyendo suero de ternera fetal (SVF).

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

20 En la presente, el medio M2 puede comprender al menos un compuesto antifúngico y/o antibiótico. Puede ser, por ejemplo, cualquier compuesto antimicótico y/o antibiótico conocido por un experto en la materia y/o disponible comercialmente. Puede ser, por ejemplo, al menos un compuesto antifúngico elegido del grupo que comprende Anfotericina B, ketoconazol y una mezcla de los mismos. Por ejemplo, puede ser al menos un compuesto antibiótico elegido del grupo que comprende penicilina, estreptomina, ciprofloxacina y una mezcla de los mismos.

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

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

30 En la presente, el medio M2 también puede comprender 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.

35 En la presente, el término "derivado" designa cualquier derivado del ácido carboxílico o del carboxilato conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, este término puede incluir derivados como ésteres o anhídridos de los ácidos correspondientes.

Ventajosamente, el ácido ascórbico permite en particular favorecer la remodelación de la matriz que contiene colágeno estimulando la síntesis de colágeno por los fibroblastos.

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

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

45 En la presente, el tiempo de cultivo de la etapa c. de fibroblastos pueden ser de 5 a 12 días, de 7 a 10 días.

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

50 En la presente, la etapa c. para el cultivo de fibroblastos sembrados en la matriz que contiene 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
- 55 - una segunda etapa c" de cultivo, de al menos 2 días en presencia de un medio M2² de cultivo de fibroblastos que contiene ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos.

60 En esta realización, el medio M2¹ de cultivo de fibroblastos corresponde al medio M2 como se definió anteriormente que no comprende ni ácido ascórbico ni ascorbato o derivado de los mismos. En este medio M2¹ y/o todos sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

65 En esta realización, el medio M2² del cultivo de fibroblastos corresponde al medio M2 como se definió anteriormente que contiene ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos. En este medio M2² y/o todos sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.

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

ES 2 772 700 T3

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

En la presente, la etapa c". de cultivo puede realizarse a una temperatura de 30 a 40 °C, de 35 a 39 °C, igual a 37 °C.

En la presente, el tiempo de cultivo de la etapa c". puede ser de 5 a 12 días, igual a 7 días.

Los inventores también demostraron ventajosamente que la matriz y los fibroblastos cultivados obtenidos en la etapa c. forman una estructura correspondiente a un sustituto de dermis.

Ventajosamente, los inventores también demostraron que la etapa c' de cultivo corresponde a una etapa de adhesión y colonización de la matriz por fibroblastos y la etapa c" permite ventajosamente una remodelación de la matriz que comprende fibroblastos para formar un sustituto dermis. En particular, la sucesión de las etapas c' y c" con el uso respectivamente de los medios M2¹ y M2² permitirá ventajosamente formar un sustituto de dermis en donde los fibroblastos no proliferan pero colonizan la matriz que comprende el colágeno, mientras que permite ventajosamente la producción de colágeno por los propios fibroblastos, permitiendo así la remodelación de la dermis.

En otras palabras, el producto obtenido al final de la etapa c. puede usarse ventajosamente como sustituto de dermis. En particular, este producto incluye todas las características fisicoquímicas de la dermis a partir de las cuales pueden originarse los fibroblastos.

Según la invención, la etapa d. del cultivo de melanocitos puede realizarse en cualquier recipiente de cultivo adecuado conocido por el experto en la materia. Puede ser una placa de Petri, un matraz de cultivo con una capacidad de 25 a 75 cm², 25, 75 o 175 cm².

En la presente el medio M3 de cultivo de melanocitos puede ser cualquier medio conocido por el experto en la materia adecuado para cultivo de melanocitos. Por ejemplo puede ser un medio disponible comercialmente, por ejemplo, un medio disponible comercialmente comercializado por la compañía Promocell con la referencia "Medio Melanocítico M2", "MBM" comercializado por Promocell, en un medio MCDB 153 comercializado por la compañía Sigma-Aldrich que comprende particularmente una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas de azúcares, por ejemplo glucosa, como se muestra en la tabla 3 a continuación:

Tabla 3: composición del medio MCDB 153

Composición	Concentración en g.l ⁻¹
Metavanadato amónico	0,000000585
Cloruro cálcico•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 Molibdicó•4 H ₂ O (amonio)	0,00000124
Cloruro de níquel•6 H ₂ O	0,00000012
Cloruro potásico	0,11183
Acetato sódico (anhidro)	0,30153
Cloruro sódico	7,599
Metasilicato sódico•9 H ₂ O	0,000142
Fosfato sódico dibásico (anhidro)	0,284088
Selenito sódico	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

(continuación)

Composición	Concentración en g.l ⁻¹
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
Mioinositol	0,01802
Niacinamida	0,00003663
Ácido D-pantoténico (hemicálcico)	0,000238
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

También puede ser un medio disponible comercialmente modificado, por ejemplo, el medio MCDDB153 que comprende además aminoácidos complementarios, por ejemplo tirosina, metionina o una mezcla de los mismos, sales inorgánicas adicionales, por ejemplo bicarbonato sódico (NaHCO₃).

5 En la presente, el medio M3 también puede comprender al menos un complemento elegido entre extracto pituitario bovino (BPE), insulina, penicilina estreptomycin (PS), hidrocortisona, suero de caballo, suero de ternera, factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), factor estimulante de granulocitos y macrófagos ("Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos" (GM-CSF)), SCF o cualquier mezcla de los mismos.

10 En la presente, el medio M3 puede comprender de 0,1 a 10 %, en peso, del 0,5 al 5 % en peso, 1 % en peso de penicilina estreptomycin (PS) 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, hidrocortisona 1,45 µM.

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 de extracto pituitario 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.

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.

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 del 1 al 5 % en peso, del 2 al 4 % en peso, 3 % en peso de suero de caballo o ternero respecto al peso total del medio.

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

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

En la presente, el tiempo de cultivo de la etapa d. puede ser entre 15 a 28 días.

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

10 Según la invención, los melanocitos obtenidos por cultivo según la etapa d. puede formar un tapiz celular de confluencia en el recipiente de cultivo. Por ejemplo, los melanocitos pueden formar un tapiz celular de 50 a 100 % de confluencia.

15 Según la invención, cuando el cultivo según la etapa d. corresponde a un tapiz celular en confluencia o no, el método también puede comprender:

- una etapa de eliminación del medio de cultivo, aclarado de las células con una solución, eliminación de la solución de aclarado,
- etapa d" de desprendimiento de células por tripsinización, y
- una etapa d" de curado.

20 En la presente, en la etapa d', la eliminación del medio de cultivo puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, una aspiración del medio, un volteo del contenedor para eliminar el medio de cultivo.

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

30 En la presente, solución de aclarado de melanocitos significa cualquier solución de aclarado de melanocitos conocida por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, una solución tampón HBSS, por ejemplo, la solución descrita en la tabla 2 anterior, solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un pH que varía de 7,2 a 7,4. También puede ser una solución tampón disponible comercialmente, por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato (PBS), una solución equilibrada de Hank comercializada respectivamente por la compañía Gibco, Sigma Aldrich, Lonza.

35 En la presente, en la etapa d' la eliminación, la solución de aclarado puede producirse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, puede ser una aspiración de la solución de aclarado, volteo del recipiente para eliminar la solución de aclarado.

40 Según la invención, la etapa d" de tripsinización puede realizarse por inmersión de células en una solución tampón (ST) que comprende tripsina, seguido de adición de suero fetal de ternera (SVF) para detener la reacción enzimática.

Según la invención, la solución tampón (ST) puede ser una solución tampón como se definió anteriormente.

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

Según la invención, el tiempo de incubación de la tripsina antes de añadir el SVF a la solución tampón puede ser de 2 a 5 min.

50 En la presente, la cantidad de SVF añadido a la solución (ST) puede estar comprendida entre 5 y 20 % en volumen con respecto al volumen total.

Según la invención, La etapa d''' de curado puede realizarse por sedimentación, centrifugación mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, una centrifugación a una velocidad de 800 a 1.200 rpm.

55 Según la invención, la etapa d''' de centrifugación puede realizarse durante un periodo de 5 a 10 min.

En la presente, la etapa d''' de centrifugación puede realizarse mediante cualquier dispositivo conocido por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, una centrifugadora giratoria comercializada por las compañías Eppendorf o Jouan.

60 En la presente, la etapa d''' de centrifugación permite sedimentar las células para separarlas del medio. El experto en la materia, por su conocimiento general, podrá adaptar/modificar la etapa d''' de centrifugación mediante cualquier técnica conocida que permita sedimentar células en un medio.

65 Según la invención, la etapa e. de cultivo de queratinocitos puede realizarse en cualquier recipiente de cultivo adecuado conocido por el experto en la materia. Puede ser una placa de Petri, un matraz de cultivo con una capacidad de 25 a 75 cm², 25, 75 o 125 cm².

- 5 En la presente, el medio M4 de cultivo de queratinocitos puede ser cualquier medio conocido por el experto en la materia adecuado para cultivo de queratinocitos. Por ejemplo puede ser un medio disponible comercialmente, 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 puede ser un medio disponible comercialmente modificado, por ejemplo, el medio MCDB153 que comprende una concentración de cloruro sódico de 0,100 a 0,110 M/l, por ejemplo 0,104M/l, una concentración de Hepes de 2 a 3×10^{-2} M/l, por ejemplo 2,29 $\times 10^{-2}$ M/l, una concentración de bicarbonato sódico de 1,10 $\times 10^{-2}$ M/l a 1,25 $\times 10^{-2}$ M/l, por ejemplo 1,19 $\times 10^{-2}$ M/l, y que comprende una concentración de arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, tirosina, valina y colina duplicada respecto a las concentraciones del medio MCDB153 no modificado.
- 10 En la presente, el medio M4 también puede comprender suplementos elegidos entre factores de crecimiento, por ejemplo factor de crecimiento epitelial (EGF), extracto pituitario bovino (BPE), insulina, penicilina-estreptomicina (PS), hidrocortisona o cualquier mezcla de los mismos. Ventajosamente, el medio M4 puede incluir suplementos de calidad clínica. Pueden ser, por ejemplo, suplementos elegidos entre factores de crecimiento, por ejemplo factor de crecimiento epitelial (EGF), insulina, penicilina-estreptomicina (PS), hidrocortisona o cualquier mezcla de los mismos.
- 15 En la presente, el medio M4 puede comprender, por ejemplo, de 0,5 a 5 % en peso, del 0,75 al 3 % en peso, 1 % en peso de penicilina-estreptomicina (PS) respecto al peso total del medio.
- 20 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, hidrocortisona 1,45 μ M.
- 25 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 pituitario bovino (BPE).
- 30 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.
- 35 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).
- 40 En la presente, el medio M4 y/o todos sus componentes puede(n) ser de calidad clínica.
- 45 En la presente, la etapa e. de cultivo de queratinocitos puede realizarse a una temperatura de 25 a 39 °C, por ejemplo igual a 37 °C.
- 50 En la presente, el tiempo de cultivo de la etapa e. puede ser de 15 a 28 días.
- 55 En la presente, el cultivo de la etapa e. de queratinocitos pueden realizarse en una atmósfera controlada que comprende al menos 5 % de CO₂.
- 60 Según la invención, los queratinocitos obtenidos por cultivo según la etapa e. puede formar una monocapa de células en el recipiente de cultivo. Puede ser, por ejemplo, una monocapa de células cercanas a confluencia, por ejemplo, del 50 al 80 % de confluencia en el recipiente de cultivo.
- 65 Según la invención, cuando el cultivo según la etapa e. corresponde a una monocapa de células cercanas a confluencia, preferentemente de 50 a 80 % de confluencia, el método también puede comprender:
- 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 desprendimiento de las células por tripsinización, y
 - una etapa e''' de centrifugación.
- 70 En la presente, en la etapa e', la eliminación del medio de cultivo puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, una aspiración del medio, volteo del recipiente para eliminar el medio de cultivo.
- 75 En la presente, en la etapa e', las células se pueden enjuagar por cualquier método conocido por el experto en la materia, por ejemplo, inmersión, aspersión, incubación de las células en una solución de aclarado de queratinocitos.
- 80 En la presente, la expresión "solución de aclarado de queratinocitos" significa cualquier solución de aclarado de queratinocitos conocida por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, una solución tampón PBS, HBSS, por ejemplo como se describe en la tabla 2 anterior, a pH que varía de 7,2 a 7,4. También puede ser una solución tampón

disponible comercialmente, por ejemplo una solución salina tamponada con fosfato (PBS), una solución equilibrada de Hank's 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 puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, puede ser una aspiración de la solución de aclarado de queratinocitos, volteo del recipiente para eliminar la solución de aclarado de queratinocitos.

10 Según la invención, la etapa e" de tripsinización puede realizarse sumergiendo las células en una solución (S) que comprende tripsina, seguido de la adición de suero de ternera fetal (SVF) para detener la reacción enzimática.

15 Según la invención, la cantidad de tripsina añadida a la solución (S) puede estar entre 0,01 y 0,05 % en peso con respecto al peso total de la solución.

Según la invención, la duración de la incubación de la tripsina antes de añadir el SVF al medio puede ser de entre 5 y 10 min.

En la presente, la cantidad de SVF añadido a la solución (S) puede estar comprendida entre 5 y 20 % en peso con respecto al peso total de la solución.

20 Según la invención, la etapa e'" de centrifugación puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, una centrifugación a una velocidad de 800 a 1.200 rpm.

Según la invención, la etapa e'" de centrifugación puede realizarse durante un periodo de 5 a 10 min.

25 En la presente, la etapa e'" de centrifugación puede realizarse mediante cualquier dispositivo conocido por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, una centrifugadora giratoria comercializada por las compañías Eppendorf o Jouan.

30 En la presente, la etapa f. de mezcla de melanocitos obtenidos en la etapa d. con queratinocitos obtenidos en la etapa e. puede realizarse mediante cualquier medio de método adecuado conocido por el experto en la materia. Por ejemplo, puede ser una mezcla de células con agitación en un medio de cultivo.

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

Ventajosamente, los inventores han demostrado sorprendentemente que cuando la mezcla de melanocitos y queratinocitos se produce con una relación 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 la piel *in vivo*.

40 En una realización preferida, la mezcla de melanocitos y queratinocitos de la etapa f. se realiza con una relación melanocitos/queratinocitos en número de 1/20 a 1/15, igual a 1/19, y la matriz que contiene colágeno es una matriz de regeneración dérmica como se definió anteriormente.

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

En la presente, la siembra del sustituto de dermis de la etapa g puede realizarse ventajosamente con una relación (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 9 a 19. De hecho, los inventores demostraron sorprendentemente que cuando la siembra de la etapa g se realiza con una relación (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 9 a 19, el sustituto de piel obtenido tiene características estructurales/biológicas idénticas a las de la piel normal.

55 En una realización preferida, la siembra del sustituto de dermis de la etapa g se realiza con una relación (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 9 a 19 y la matriz que contiene colágeno es una matriz de regeneración dérmica como se definió anteriormente.

60 En la presente, por medio M5 de cultivo de piel se entiende que significa cualquier medio conocido por el experto en la materia adecuado para cultivo de piel. Por ejemplo puede ser un medio disponible comercialmente, por ejemplo, un medio verde modificado, es decir, que comprende 2/3 de "medio mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbecco/Vogt" (DMEM); 1/3 de medio "Ham's F12" y que comprende el 10 % de mezcla de suero de ternera fetal (SVF) comercializado por la compañía Gibco que comprende en particular una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, azúcares, por ejemplo glucosa. También puede ser un medio verde modificado, es decir, un medio
65

verde libre de toxina del cólera, triiodotironina, o una mezcla de "Medio de Dulbecco modificado por Iscove" (IMDM) y medio MCDB153 que comprende 10 % de FCS; o de una mezcla IMDM/"queratinocitos dermalife" que comprende el 10 % de SVF comercializado respectivamente por la compañía Gibco, Lifescience, Promocell y Sigma Aldrich.

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

10 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.

Ventajosamente, cuando el medio M5 comprende ácido hialurónico o un hialuronato y/o un derivado de los mismos, no incluye extracto pituitario bovino.

15 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.

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

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

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

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

30 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 incluir:

- 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 que no contiene ácido hialurónico, ni hialuronato, ni ácido ascórbico ni ascorbato,
- 35 - una segunda etapa h.² de cultivo de 0 a 7 días, preferentemente al menos 2 días, en presencia de un medio M5² de cultivo que contiene ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos, y
- una tercera etapa h.³ de cultivo de al menos 2 días en un medio M5³ que contiene ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos, y ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos.

40 El medio M5¹ de cultivo del sustituto de piel corresponde al medio M5 como se definió anteriormente que no comprende ni ácido ascórbico ni ascorbato o derivado de los mismos.

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

45 El medio M5² de cultivo del sustituto de piel corresponde al medio M5 como se definió anteriormente que contiene ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos que está libre de ácido ascórbico, ascorbato y un derivado de los mismos.

50 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 sustituto de piel corresponde al medio M5 como se definió anteriormente que contiene ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos y ácido ascórbico o ascorbato o un derivado de los mismos.

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

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

60 En la presente, la etapa h'. de cultivo puede realizarse a una temperatura de 25 a 40 °C, por ejemplo igual a 37 °C.

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.

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

Ventajosamente, los inventores demostraron que la etapa h' permite favorecer la adhesión de los melanocitos y queratinocitos al sustituto de dermis.

5 En la presente invención, la etapa h". de cultivo puede realizarse por deposición en un medio de cultivo M5² del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h'. o inmersión o inundación del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h' en un medio de cultivo M5².

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

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

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

15 En la presente invención, la etapa h"', de cultivo puede realizarse por 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"., dicho sustituto sumergiéndose en dicho medio hasta la interfaz aire-líquido, o dicho medio se sumerge al ras del medio.

20 En la presente, "al ras con el medio" significa sumergir el sustituto en el medio para cubrir el sustituto en toda su altura sin sumergir su parte superior.

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

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

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

30 Ventajosamente, los inventores demostraron que la inmersión del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h". en un medio de cultivo M5³ que contiene ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos y ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos hpermite favorecer la formación de la unión dermoepidérmica y, por tanto, garantiza una mejor polarización de las células del sustituto de dermis sembrado.

35 Ventajosamente, los inventores también demostraron que la inmersión en la interfaz aire-líquido o el aclarado con el medio del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h". en un medio de cultivo M5³ que contiene ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos y ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos permite la diferenciación de la epidermis, favoreciendo así la formación de un estrato córneo en el sustituto de piel o equivalente.

40 Ventajosamente, los inventores también demostraron que la inmersión en la interfaz aire-líquido o el aclarado con el medio del sustituto de dermis sembrado obtenido en la etapa h" en un medio de cultivo M5³ que contiene ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos y ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos permite el mantenimiento del alto poder proliferativo de las células de la capa basal y un gradiente decreciente de poder proliferativo simultáneo con el aumento en la diferenciación de la epidermis similar a los gradientes observados en la piel *in vivo*.

50 Ventajosamente, los inventores también demostraron que cuando el medio M5 comprende ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos, esto permite, de manera sorprendente, mejorar la calidad del sustituto de piel o equivalente.

55 Ventajosamente, los inventores demostraron que el método permite ventajosamente obtener un sustituto de piel o un equivalente de piel que comprende todas sus capas constituyentes. También, el sustituto de piel obtenido según el método de la invención tiene características similares a las de la piel nativa, a diferencia de los sustitutos de la piel conocidos en el estado de la técnica.

60 Ventajosamente, los inventores también demostraron que el método permite obtener un sustituto de dermis y/o un sustituto de piel de un tamaño mucho mayor que los conocidos en el estado de la técnica. En particular, el método permite ventajosamente 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 demostraron ventajosamente que el método hace posible obtener un sustituto de dermis o equivalente y/o un equivalente o sustituto de piel con una capacidad de amplificación mínima de 6.

65 Asimismo, los inventores también demostraron ventajosamente que el método según la invención hace posible obtener una dermis y/o un sustituto de piel que puede manipularse con propiedades viscoelásticas, permitiendo

ventajosamente evitar cualquier posible desgarrado/deterioro físico de dicho sustituto durante su manipulación.

5 Asimismo, la duración de la preparación del sustituto de dermis y/o piel según el método de la invención es generalmente inferior a 30 días y, por lo tanto, es compatible con los requisitos para el cuidado de las víctimas de quemaduras en particular.

La presente invención también se refiere a un sustituto de piel capaz de obtenerse usando el método como se definió anteriormente.

10 Ventajosamente, los inventores demostraron que el sustituto de piel comprende melanocitos al nivel de la capa basal formando una unidad de melanización epidérmica.

Ventajosamente, el sustituto de piel susceptible de obtención con el método de la invención, debido a la presencia de melanocitos presenta ventajosamente pigmentación constitutiva.

15 Ventajosamente, el sustituto de piel tiene un tamaño mucho mayor que los conocidos en el estado de la técnica, permitiendo en particular para heridas grandes, la aplicación de solo uno o un número menor de sustitutos de la piel en comparación con los del estado de la técnica. La reducción en el número de sustitutos de piel que se aplicarán también permite ventajosamente reducir los costes de tratamiento mientras se acelera este último.

20 La presente invención también se refiere a un sustituto de dermis que se puede obtener en la etapa c. del método.

Ventajosamente, el sustituto de dermis puede incluir colágeno de tipo IV recién formado.

25 Ventajosamente, el sustituto de dermis comprende al menos una matriz que contiene colágeno de tipo I en donde se distribuyen los fibroblastos. También puede contener otros componentes de la matriz extracelular, por ejemplo moléculas como colágenos, en particular colágeno IV, lamininas, glicosaminoglicanos.

30 Ventajosamente, el sustituto de dermis tiene un tamaño mucho mayor que los conocidos en el estado de la técnica, lo que hace posible en particular para heridas grandes, la aplicación de un único o menor número de sustitutos en comparación con los del estado de la técnica. La reducción del número de sustitutos que se aplicarán también permite ventajosamente reducir los costes de procesamiento mientras se acelera el tratamiento de parte, por ejemplo, la provisión de un solo dispositivo que cubre toda la superficie a tratar.

35 Los inventores también demostraron que el sustituto de dermis y/o el sustituto de piel según la invención puede usarse ventajosamente para cubrir pérdidas de sustancia, el sustituto de dermis y/o el sustituto de piel según la invención, por lo tanto, puede usarse ventajosamente como injerto.

40 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un injerto que consiste en un sustituto de piel como se definió anteriormente o un sustituto de dermis como se definió anteriormente.

45 En la presente, el injerto según la invención puede usarse como un medio para tratar un trastorno cutáneo y/o una pérdida de sustancia cutánea. En particular, el injerto según la invención puede usarse como un medio para tratar un trastorno cutáneo y/o una pérdida de sustancia cutánea elegido del grupo que comprende una quemadura, falta de cicatrización, relacionado con una herida traumática o una herida crónica, trastorno pigmentario, hemangioma y cáncer de piel.

50 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para tratar un trastorno cutáneo que comprende el trasplante o la implantación de un sustituto de piel o un sustituto de dermis según la invención.

55 En la presente, La implantación del sustituto de piel puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, la aplicación directa del sustituto en la zona a tratar, por ejemplo según el método descrito en Peña, *et al.* Uso de equivalentes de piel autóloga con matriz dérmica artificial (Integra) en la cobertura del sitio donante en colgajos radiales libres de antebrazo: Preliminary Cases J Oral and Maxillofacial Surgery, 70:10 10, 2012 [10].

60 En la presente, el trasplante del sustituto de piel puede realizarse mediante cualquier método conocido por el experto en la materia. Puede ser, por ejemplo, un método que comprende una primera etapa de determinación y eliminación de una zona de piel/dermis a eliminar, seguido de una segunda etapa de incorporación del sustituto en la zona que queda libre. También puede ser el método descrito 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].

65 En el método de tratamiento, por trastorno cutáneo se entiende una quemadura, un defecto cicatricial relacionado con una herida traumática o una herida crónica, trastorno pigmentario, hemangioma y cáncer de piel.

Por tanto, el método de tratamiento puede permitir el reemplazo de una piel herida y/o dañada y/o patológica con un

sustituto de piel sano.

El método de tratamiento puede incluir el trasplante del sustituto de piel después de la extracción, por ejemplo, un nevus melanocítico, un nevus melanocítico gigante, melanoma, hemangioma, porome ecrino.

5 El método de tratamiento también puede incluir implantar y/o aplicar un sustituto de piel en una quemadura y/o una herida profunda y/o una herida crónica, por ejemplo una herida diabética.

10 Ventajosamente, los inventores demostraron sorprendentemente, cuando el sustituto o equivalente de piel se obtuvo según el método de la invención en donde el medio M5 comprende ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos, una aceleración de la reparación tisular, especialmente cuando se trata un trastorno cutáneo.

15 La presente invención también se refiere a un kit para realizar el método según la invención que comprende un medio M1 de cultivo de fibroblastos, una matriz que contiene colágeno, un medio M2 de cultivo de fibroblastos en la matriz que contiene ácido ascórbico o ascorbato o derivado de los mismos, un medio M3 de cultivo de melanocitos, un medio M4 de cultivo de queratinocitos y un medio M5 de cultivo de piel.

20 La presente invención también se refiere a un kit para realizar el método según la invención que comprende un medio M1 de cultivo de fibroblastos, una matriz que contiene colágeno, un medio M2¹, un medio M2² de cultivo de fibroblastos en la matriz que contiene colágeno, un medio M3 de cultivo de melanocitos, un medio M4 de cultivo de queratinocitos, un medio M5¹ y/o un medio M5² y/o un medio M5³ de cultivo de piel.

Los medios M1, M2, M2¹, M2², M3, M4, M5, M5¹, M5² y M5³ son como se definieron anteriormente.

25 La presente invención también se refiere a un método de injerto de piel que comprende las etapas de:

- tomar una muestra de piel de una zona no afectada en un individuo,
- preparación de un sustituto de piel según la invención utilizando fibroblastos, queratinocitos y fibroblastos de la muestra tomada, y
- 30 - el injerto del sustituto obtenido en el individuo.

El experto en la materia podrá seguir viendo otras ventajas al leer los ejemplos a continuación, ilustrados por las figuras adjuntas, dadas con fines ilustrativos.

35 Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa un diagrama de las etapas que hacen posible obtener un sustituto/equivalente de piel.

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

40 La figura 3 A es una fotografía de un sustituto de dermis obtenido en la etapa c de microscopía óptica después de tinción de fibroblastos. La figura 3B es una fotografía de un sustituto de piel obtenido de pequeño tamaño, es decir, 0,5 cm².

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

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

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

50 La figura 6 representa fotografías en microscopía óptica de equivalente de piel (figura 6 A a D) obtenidas según el método con una proporción de células sembradas (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 13,3 (figuras 6 A y B); marcado inmunohistoquímico de melanocitos en posición basal (figura 6 C, zonas claras) y la producción de la lámina basal, marcado de colágeno IV (figura 6D (2)) y marcador de proliferación p63 (figura 6 D (1)). Las figuras 6E y 6F representan fotografías de microscopía óptica de la piel después del marcado inmunohistoquímico de melanocitos en posición basal (figura 6E, zonas claras), marcado de colágeno IV (figura 6F (2)) y marcador de proliferación p63 (figura 6F (1)).

Ejemplos

60 Ejemplo 1: Ejemplo de fabricación de un sustituto de piel

En el presente ejemplo, las células utilizadas provienen de una biopsia de piel realizada en plásticas mamarias realizadas previamente en un paciente

65 La biopsia fue realizada por un cirujano plástico y la biopsia se colocó en un tubo estéril que contenía suero fisiológico.

A partir de la biopsia, las células se aislaron de la siguiente manera:

1. Aislamiento de células epiteliales

- a. Aclarado de la biopsia en HBSS (solución salina equilibrada de Hank) estéril
- 5 b. Extracción de tejido adiposo por un técnico biólogo utilizando un bisturí
- c. Incubación con tripsina-EDTA precalentada a 37 °C entre 3 y 24 h
- d. Neutralización con SVF irradiado (inhibidor de tripsina)
- e. Eliminación de la epidermis y raspado con bisturí de la capa basal donde se encuentran las células altamente proliferativas (p63 positivas)
- 10 f. Filtración, centrifugación a 1.200 rpm y siembra del sedimento a 100.000 células por cm² en medio MCDB153 modificado* que comprende los compuestos mencionados en la tabla 4 a continuación en donde las concentraciones de L arginina, L histidina, L isoleucina, L leucina, L metionina, L fenilalanina, L treonina, L-triptófano, L tirosina, L valina, 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, el pH del medio se ajustó a 7,4 y antibióticos (penicilina y estreptomycinina al 1 %) para los queratinocitos.
- 15 Para los melanocitos, Filtración, centrifugación a 1.200 rpm y siembra del sedimento a 100.000 células por cm² en medio MCDB153 modificado* que comprende los compuestos mencionados en la tabla 4 a continuación que comprende además 5,88 g de bicarbonato sódico/5 l, 0,272 g de tirosina/5 l y 0,157 g de L Metionina/5 l, el pH del medio se ajusta a 7,4

20

Tabla 4: composición normal del medio MCDB 153

Composición	Concentración en g.l ⁻¹
Metavanadato amónico	0,000000585
Cloruro cálcico•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 potásico	0,11183
Acetato sódico (anhidro)	0,30153
Cloruro sódico	7,599
Metasilicato sódico•9H ₂ O	0,000142
Fosfato sódico dibásico (anhidro)	0,284088
Selenito sódico	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
Mioinositol	0,01802
Niacinamida	0,00003663
Ácido D-pantoténico (hemicálcico)	0,000238

(continuación)

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 al 5 % de CO₂ durante una semana con cambio del medio cada 3 días.

h. Después de aproximadamente una semana: tripsinización diferencial = tripsinización con 0,025 % de tripsina y EDTA 0,0,1M (1-2 minutos para desprender los melanocitos, 10 minutos para desprender los queratinocitos). Los melanocitos se desprenden primero, lo que permite purificar los cultivos.

5 Neutralización con SVF irradiado, centrifugación a 1200 rpm y siembra del sedimento para amplificación en el mismo medio.

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

10 **2. Aislamiento de fibroblastos**

a. Aclarado de la parte dérmica con HBSS,

b. Incubación de la dermis con colagenasa al 1 % a 37 °C máximo 3 horas dependiendo del tipo de dermis.

c. Neutralización con SVF irradiado.

15 d. Filtración a través de un tamiz celular de 40 µm, centrifugación a 1200 rpm con una centrífuga GR 2022 durante 5 minutos y siembra del sedimento a 100.000 células por cm² en DMEM que comprende SVF al 10 % irradiado y penicilina y estreptomycinina al 1 % durante 24 horas.

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

20 **3. Preparación de un sustituto de piel**

a. Tripsinización de fibroblastos con tripsina al 0,025 % y EDTA 0,0,1M durante 10 minutos y luego neutralización con SVF irradiado, centrifugación a 1200 rpm con una centrifugadora GR 2022 durante 5 minutos, y siembra en DMEM que comprende FCS al 10 % en una matriz dérmica de origen colagénico estéril, es decir, una matriz Integra (marca registrada) previamente aclarada con solución salina equilibrada de Hank ("Solución equilibrada de sal de Hank" (HBSS) 3 veces a una velocidad de 30.000 fibroblastos por cm² en una cámara de incubación de acero inoxidable preparada a medida.

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

30 c. La matriz sembrada se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % en DMEM que comprende FCS al 10 % irradiado y penicilina y estreptomycinina al 1 % y ácido ascórbico 50 mg/ml, durante 1 semana con cambio de medio cada 3 días.

d. La tripsinización de queratinocitos y melanocitos con tripsina al 0,025 % y EDTA 0,0,1M de 1 a 2 minutos para eliminar los melanocitos de las placas de cultivo de melanocitos, durante 10 minutos para eliminar los queratinocitos de las placas de cultivo de queratinocitos. Neutralización con SVF irradiado 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. Inmersión durante 7 días en medio verde modificado:DMEM/F12 de Ham/FCS al 10 % que contiene ácido hialurónico a 50 mg/ml.

40 g. Interfaz durante 7 días en medio verde 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 estreptomycinina al 1 %.

La figura 1 representa un esquema de las etapas que permiten obtener un sustituto de piel.

45 En el presente ejemplo, dos sustitutos de la piel obtenidos tenían relaciones (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 13,3. Para la relación de 13,3, durante las etapas de deposición de fibroblastos y queratinocitos/melanocitos, las cantidades de células sembradas fueron respectivamente 15.000 para fibroblastos, 10.000 para melanocitos y 190.000 para queratinocitos.

50 Una vez obtenido el sustituto, se fijó en formalina al 4 %, se incluyó en parafina luego se hizo un corte de 4 µm, luego se realizó una tinción con hematoxilina-eosina para marcar las diferentes capas de la piel. Se realizó una observación

con 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 de microscopía óptica de un sustituto de piel obtenido según el método en donde la relación (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos fue 13,3. La figura 2C representa una fotografía de microscopía óptica de un sustituto de piel obtenido según el método en donde la proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos fue de 6,7 y la figura 2A una fotografía de microscopía óptica de una biopsia de piel normal. Las figuras 6A y 6B también representan fotografías en microscopía óptica del equivalente de piel obtenidas según el método en donde la proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos fue 13,3.

Por otro lado, El marcado inmunohistoquímico del sustituto obtenido según el método en donde la proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos fue 13,3 y una piel *in vivo* se realizó según el método descrito en Salducci, M., André, N., Guéré, C., Martin, M., Fitoussi, R., Vié, K., y Cario-André, M. (2014). Los factores secretados por fibroblastos envejecidos irradiados inducen léntigo solar en la epidermis reconstruida pigmentada. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, 502-504 [12] ou Simon, D., Daubos, A., Pain, C., Fitoussi, R., Vié, K., Taieb, A., de Benetti, L., y Cario-André, M. (2013). Exposure to acute electromagnetic radiation of mobile phone exposure range alters transiently skin homeostasis of a model of pigmented reconstructed epidermis. *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 27-34 [13] para identificar la presencia de melanocitos en el sustituto, la producción de lámina basal que comprende en particular colágeno IV (figura 6D (2)), la capacidad de proliferación de las células a nivel de la lámina basal (figura 6D (1)) y la presencia de melanocitos (figura 6C). Las figuras 6 E y 6F representan fotografías de microscopía óptica de piel *in vivo* después del marcado inmunohistoquímico de los melanocitos en la posición basal (figura 6 E, zonas claras), marcado de colágeno IV (figura 6F (2)) y del marcador de proliferación p63 (figura 6 F (1)). A partir de las figuras 6C y 6D es evidente que el sustituto de piel según la invención comprende melanocitos, una lámina basal como se demuestra por la presencia de colágeno IV al nivel del cual las células presentes son altamente proliferativas en cuanto a la piel *in vivo* (figuras 6 E y 6 F).

Como se muestra en estas fotografías, el sustituto obtenido con el método tiene una estructura idéntica a la de la piel *in vivo*.

Ejemplo 2: Trasplante de un sustituto de dermis según la invención en ratones

En este ejemplo, el sustituto de piel utilizado fue el sustituto obtenido como se describe en el ejemplo 1 con células obtenidas de plástias mamarias con la proporción (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 13,3. Los ratones utilizados fueron ratones desnudos swiww nu/nu de Jackson Lab.

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

Se realizó una incisión en el ratón utilizando un bisturí en una zona de 5 cm² para eliminar la dermis y la epidermis, Se realizó una limpieza de la zona escarificada con solución salina fisiológica. Un sustituto de piel previamente preparado se aplicó en la zona escarificada para cubrirlo (figura 4 A, línea 1) luego la zona injertada se cerró con la piel del ratón que se suturó (figura 4 B, línea 1).

Los ratones se mantuvieron en un animalario especializado solo por jaula mientras el injerto prendía y luego 5 en jaulas de tamaño adecuado.

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

Después de 3 semanas, se realizó una observación visual del injerto (figuras 4 B y B, línea 3).

Como se muestra en la figura 4, es evidente que el sustituto de dermis se puede aplicar ventajosamente, especialmente para un trasplante sin inducir efectos secundarios.

Asimismo, para estudiar el estado estructural del sustituto de dermis después de tres semanas después de la aplicación, se tomó una muestra cortando el sustituto con un bisturí. El sustituto se fijó en formalina al 4 %, se incluyó en parafina luego se hizo un corte de 4 µm, luego se realizó una tinción con hematoxilina-eosina para marcar las diferentes capas de la piel. Se realizó una observación con 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 5 representa las fotografías de microscopía óptica de sustitutos injertados. En particular, la figura 5 A, muestra el sustituto colonizado por fibroblastos murinos, que son pocos y no han comenzado a modificar el colágeno. La figura 5 B muestra el sustituto colonizado con fibroblastos humanos antes del injerto. Se observa una gran cantidad de fibroblastos y una remodelación de la matriz, en particular en la zona superficial con conjuntos más gruesos de colágeno. Por tanto, el presente ejemplo demuestra claramente que la presencia de todas las células permite obtener un sustituto fácilmente integrado, que no se degrada con el tiempo y que madura después del injerto, que se acelera

en presencia de fibroblastos en la matriz.

Listado de referencias

- 5 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.
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.
- 10 3. Kogut *et al.*, "Differentiation of human induced pluripotent stem cells into a keratinocyte lineage" *Methods Mol Biol* 2014, 1195:1-12.
4. Ohta *et al.*, "Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells" *Methods Mol Biol*, 2013; 989:193-215.
5. Revilla *et al.*, "Current advances in the generation of human iPS cells: implications in cell-based regenerative medicine". *J Tissue Eng Regen Med*, 2015, Mar 11.
- 15 6. Bell *et al.*, 1979.
7. Boyce ST *et al.*, "Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes", octubre de 1988; 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.
- 20 9. Wonhye Lee *et al.*, "Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication". *Biomaterials*, 2009, marzo; 30(8):1587-95.
10. Peña, *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.
- 25 12. Salducci, M., André, N., Guéré, C., Martin, M., Fitoussi, R., Vié, K., y Cario-André, M. (2014). Los factores secretados por fibroblastos envejecidos irradiados inducen léntigo solar en la epidermis reconstruida pigmentada. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, 502-504.
13. Simon, D., Daubos, A., Pain, C., Fitoussi, R., Vié, K., Taieb, A., de Benetti, L., y Cario-André, M. (2013). Exposure to acute electromagnetic radiation of mobile phone exposure range alters transiently skin homeostasis of a model of pigmented reconstructed epidermis. *Int. J. Cosmet. Sci.* 35, 27-34.
- 30

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar un sustituto de piel que comprende las siguientes etapas:
 - 5 a. cultivar fibroblastos en un medio M1 de cultivo de fibroblastos;
 - b. sembrar una matriz que contiene colágeno con fibroblastos obtenidos en la etapa a;
 - c. cultivar fibroblastos sembrados en la matriz que contiene colágeno en un medio M2 de cultivo de fibroblastos que contiene ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos, la matriz y los fibroblastos cultivados formando un sustituto de dermis;
 - 10 d. cultivar melanocitos en un medio M3 de cultivo de melanocitos;
 - e. cultivar queratinocitos en un medio M4 de cultivo de queratinocitos;
 - f. mezclar melanocitos obtenidos en la etapa d con queratinocitos obtenidos en la etapa e;
 - g. sembrar el sustituto de dermis obtenido en la etapa c con la mezcla obtenida en la etapa f; en donde la siembra en la etapa g se realiza con una relación (queratinocitos + melanocitos)/fibroblastos de 9 a 19, y
 - 15 h. cultivar el sustituto de dermis sembrado en la etapa g en un medio M5 de cultivo de piel formando así el sustituto de piel.
2. Método según la reivindicación 1, en donde el medio M5 comprende ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos.
- 20 3. Método según la reivindicación 2, en donde el medio M5 comprende ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la mezcla de melanocitos y queratinocitos de la etapa f se realiza con una relación melanocitos/queratinocitos de 1/20 a 1/15.
- 25 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde 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 contiene colágeno.
- 30 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa c. incluye 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 contiene ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos.
- 35 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la etapa h. comprende:
 - una primera etapa h.' de cultivo de 6 a 24 horas en presencia de un medio M5¹ de cultivo que no contiene ácido hialurónico, ni hialuronato, ni ácido ascórbico y ni ascorbato,
 - una segunda etapa h." de cultivo de al menos 2 días de presencia de un medio M5² de cultivo que contiene ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos, y
 - 40 - una tercera etapa h.'" de cultivo de al menos 2 días en un medio M5³ que contiene ácido hialurónico o un hialuronato o un derivado de los mismos, y ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos.
- 45 8. Sustituto de piel susceptible de obtención realizando el método definido en cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
9. Sustituto de piel según la reivindicación 8, en donde los fibroblastos son autólogos de un individuo para trasplante de dicho sustituto de piel en dicho individuo.
- 50 10. Sustituto de piel según la reivindicación 9, en donde los fibroblastos, los melanocitos y queratinocitos son autólogos de un individuo.
11. Sustituto de dermis susceptible de obtención en la etapa c. del método definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 55 12. Injerto constituido por un sustituto de piel según la reivindicación 9 o 10 o un sustituto de dermis según la reivindicación 11.
13. Injerto según la reivindicación 12 para uso como medio para tratar un trastorno cutáneo y/o pérdida de sustancia cutánea.
- 60 14. Injerto para uso según la reivindicación 13 en donde el trastorno cutáneo y/o pérdida de sustancia cutánea se selecciona del grupo que consiste en una quemadura, falta de cicatrización, una herida crónica, trastorno pigmentario, hemangioma y cáncer de piel.
- 65 15. Kit para realizar el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende un medio M1 de

cultivo de fibroblastos, una matriz que contiene colágeno, un medio M2 de cultivo de fibroblastos que contiene ácido ascórbico o un ascorbato o un derivado de los mismos, un medio M3 de cultivo de melanocitos, un medio M4 de cultivo de queratinocitos y un medio M5 de cultivo de piel.

- 5 16. Kit según la reivindicación 15 en donde los medios M1 a M5 son independientemente medios de calidad clínica.

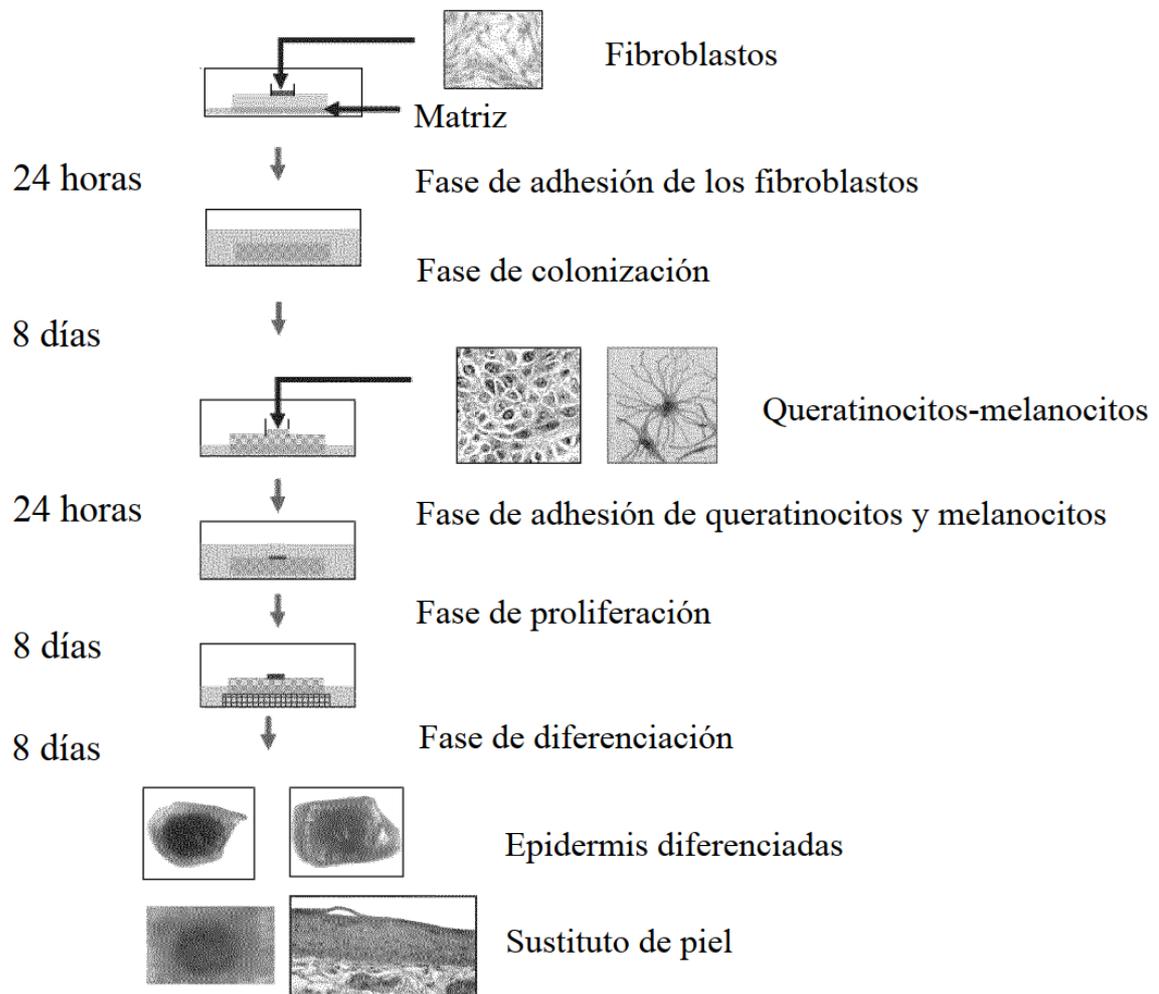
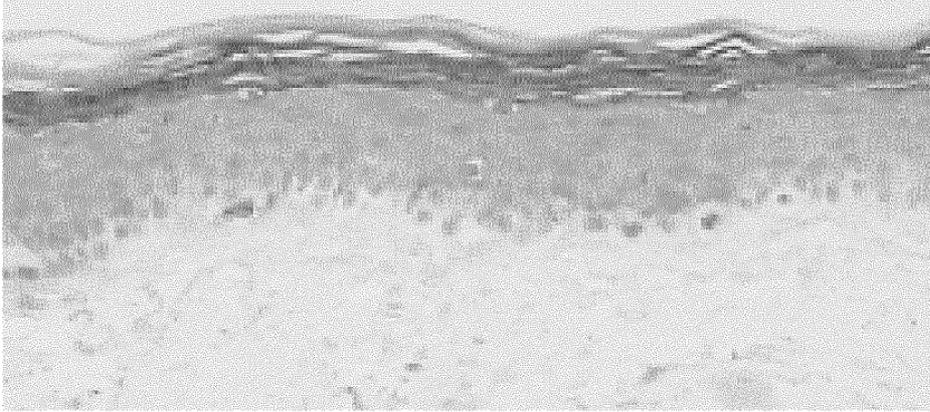
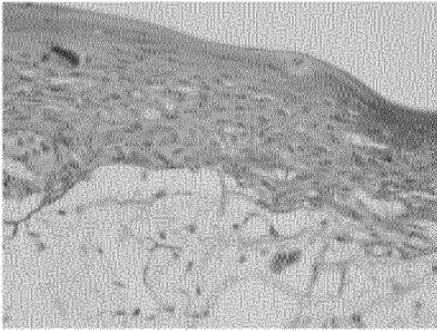


FIGURA 1

A



B



C

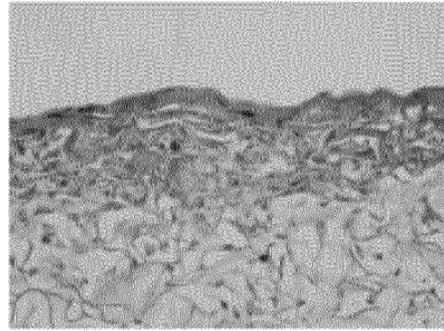


FIGURA 2

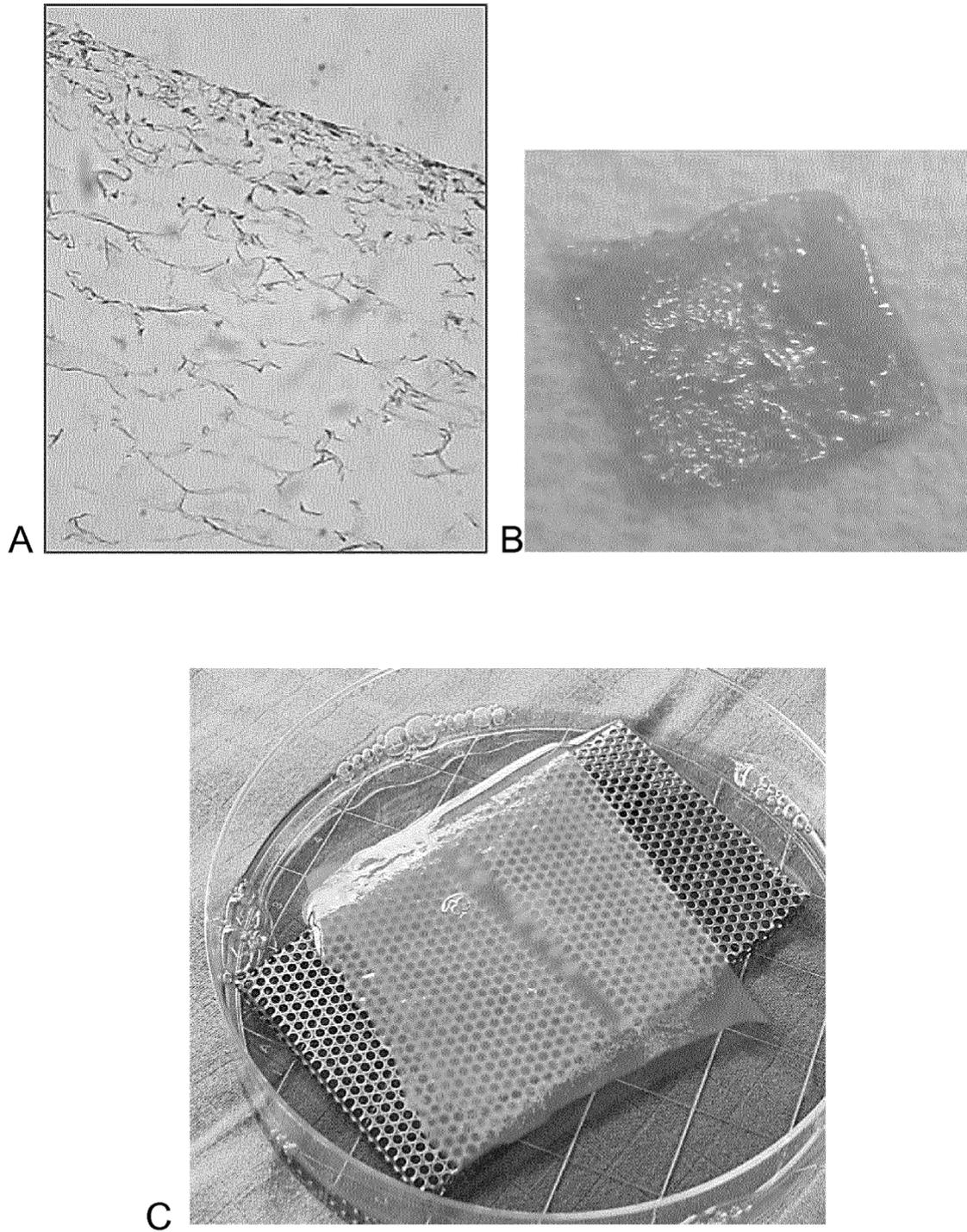


FIGURA 3

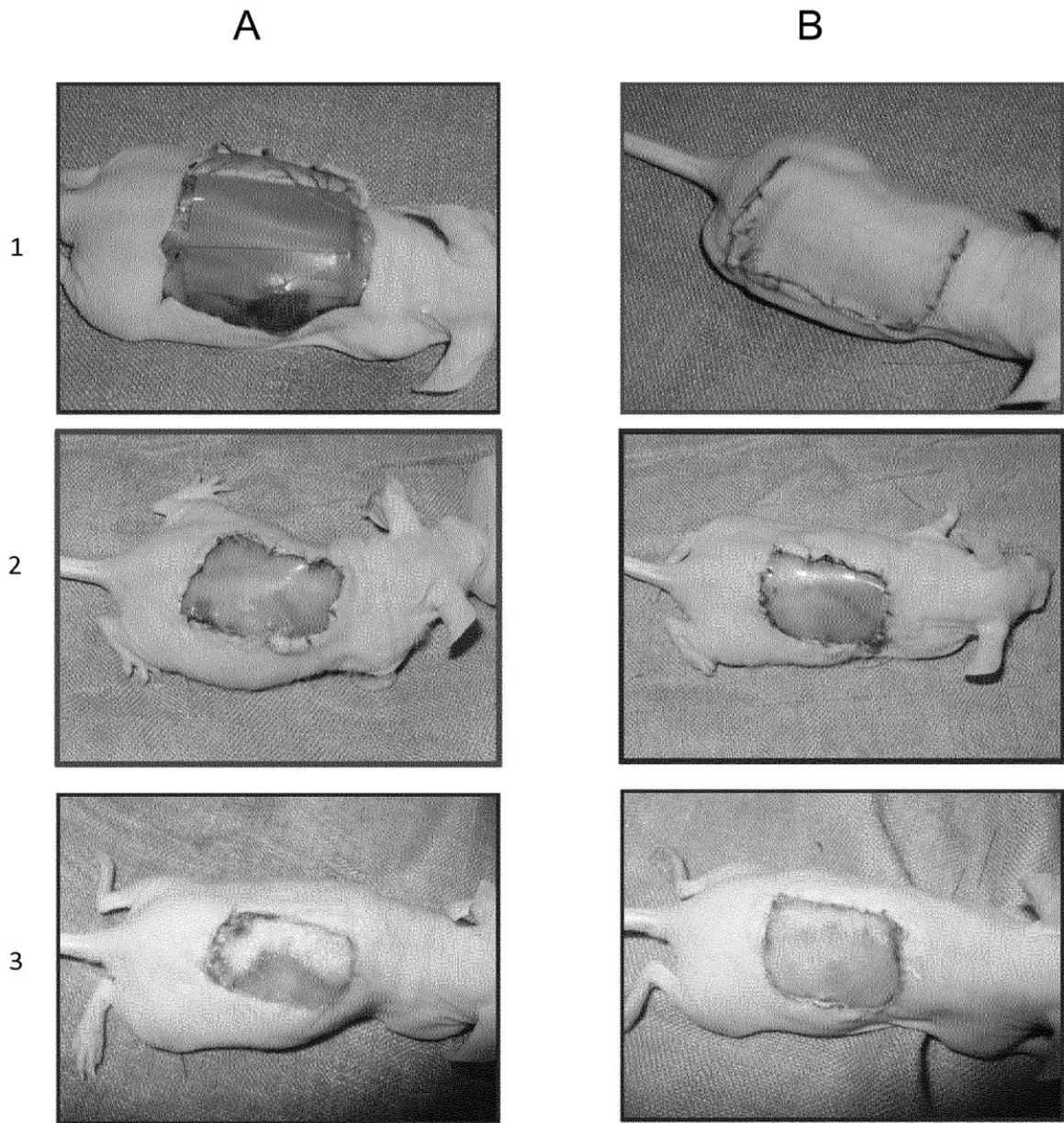
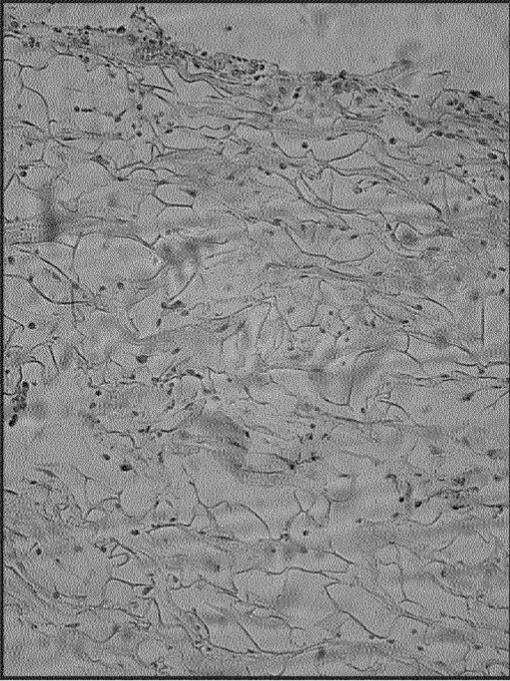


FIGURA 4

A



B

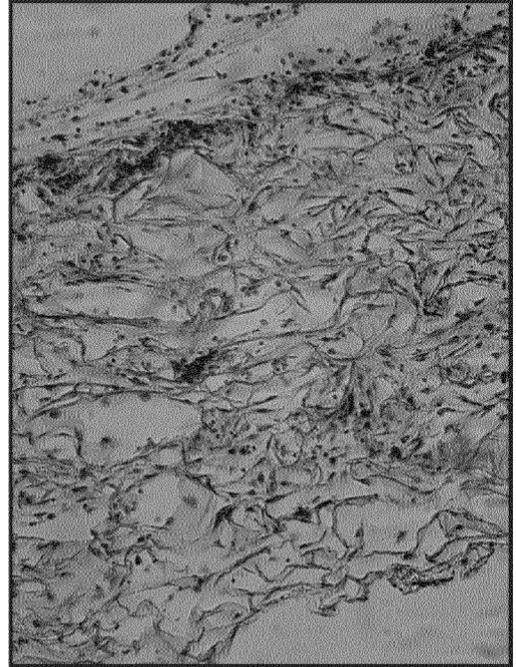


FIGURA 5

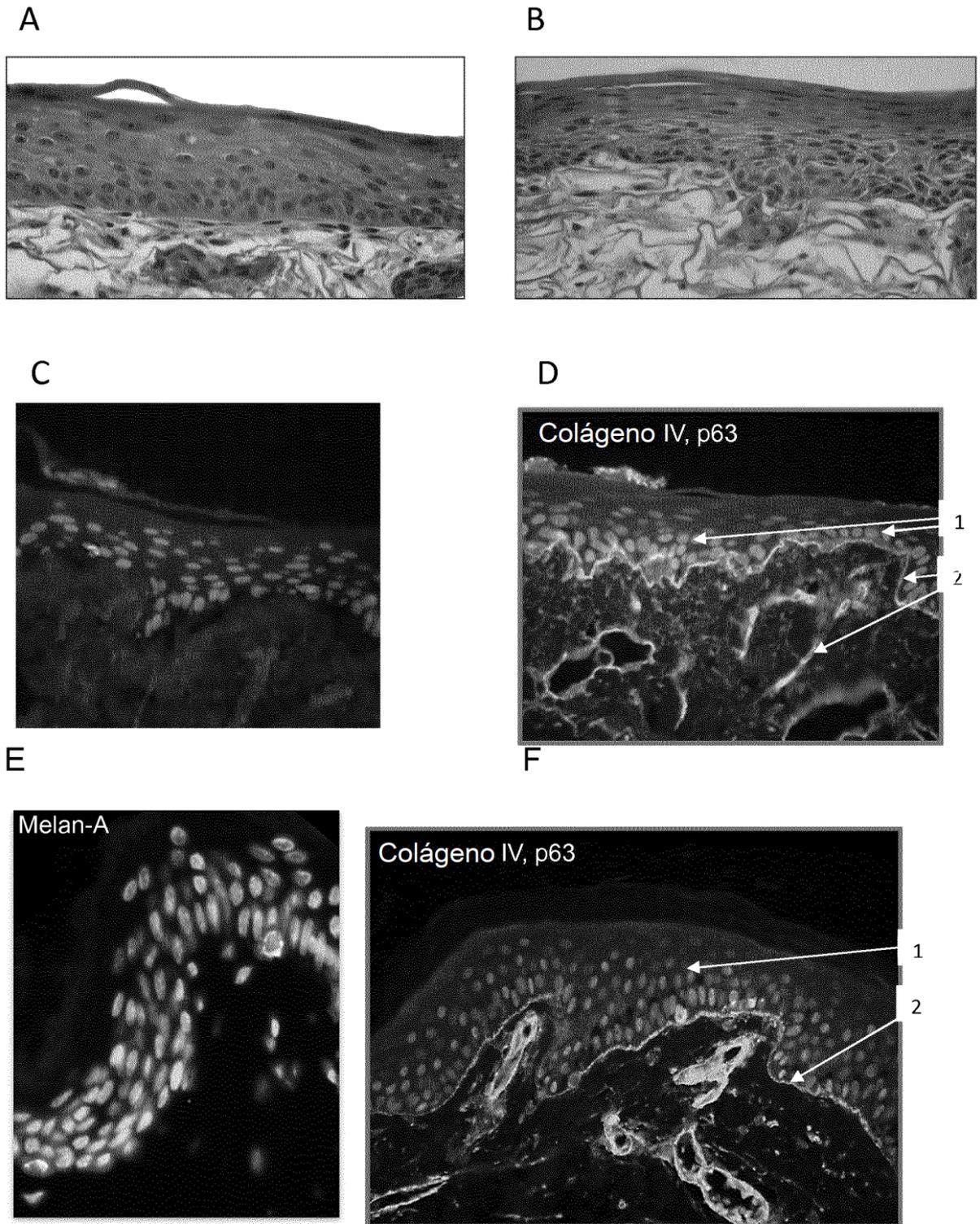


FIGURA 6