

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
9 de Enero de 2003 (09.01.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/002154 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 48/00,
C12N 15/16, A61F 2/10, A61P 5/00

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00320

(22) Fecha de presentación internacional:
28 de Junio de 2002 (28.06.2002)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200101526 29 de Junio de 2001 (29.06.2001) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO DE INVESTIGACIONES ENERGETICAS MEDIOAMBIENTALES Y TECNOLOGICAS (C.I.E.M.A.T.) [ES/ES]; Avenida Complutense, 22, E-28040 Madrid (ES). CENTRO COMUNITARIO DE

TRANSFUSION DE ASTURIAS-CRUZ ROJA ESPAÑOLA [ES/ES]; Emilio Rodríguez Vigil, s/n, E-33006 Oviedo (Asturias) (ES). FUNDACION MARCELINO BOTIN [ES/ES]; Pedruca, 1, E-39003 Santander (ES).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): JORCANO NOVAL, Jose Luis [ES/ES]; Avenida Complutense, 22, E-28040 Madrid (ES). LARCHER LAGUZZI, Fernando [ES/ES]; Avenida Complutense, 22, E-28040 Madrid (ES). MEANA INFIESTA, Alvaro [ES/ES]; Emilio Rodríguez Vigil, s/n, E-33006 Oviedo (ES). DEL RIO NECHAEVSKY, Marcela [ES/ES]; Avenida Complutense, 22, E-28040 Madrid (ES).

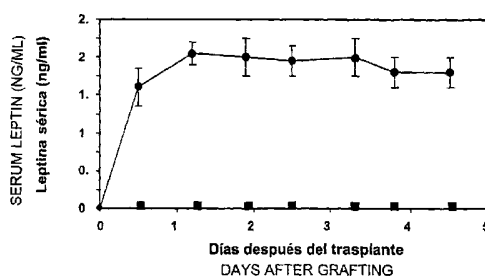
(74) Mandatario: GARCIA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro Maria; Vitruvio, 23, E-28006 Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: ARTIFICIAL AUTOLOGOUS SKIN SECRETING LEPTIN AND METHOD FOR OBTAINING THE SAME

(54) Título: PIEL ARTIFICIAL AUTOLOGA SECRETORA DE LEPTINA Y METODO DE OBTENCION



■ Trasplante piel artificial no modificada genéticamente
GENETICALLY NON-MODIFIED ARTIFICIAL SKIN GRAFT

● Trasplante piel artificial secretora de leptina
LEPTIN SECRETING ARTIFICIAL SKIN GRAFT

(57) Abstract: The invention relates to an artificial autologous skin that includes genetically modified keratinocytes by infection with a retroviral vector carrying the gene coding for human leptin on an artificial autologous skin basically obtained by gelification with Ca²⁺ from plasma with platelets. The method to obtain said skin involves the following steps: obtaining the plasma with platelets by means of light centrifugation; cultivating dermal cells from a biopsy; gelifying the plasma with platelets using calcium salts and seeding the cultivated dermal cells inside the fibrin matrix; cultivating keratinocytes from a biopsy; genetically modifying the keratinocytes by infection with a retroviral vector carrying the gene coding for human leptin; cultivating the genetically modified keratinocytes until their confluence; selecting the genetically modified keratinocytes using a marker gene; seeding the selected keratinocytes on the artificial dermis obtained after the first three steps.

[Continúa en la página siguiente]



WO 03/002154 A1



CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) Resumen: Incorpora queratinocitos modificados genéticamente mediante su infección con un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana sobre una dermis artificial autóloga obtenida, básicamente, por la gelificación con Ca^{++} de plasma con plaquetas. El método de obtención comprende las etapas de: - Obtención del plasma con plaquetas mediante centrifugación ligera - Cultivo de células dérmicas a partir de una biopsia - Gelificación del plasma con plaquetas mediante sales de calcio, sembrando en el interior de la matriz de fibrina las células dérmicas cultivadas. - Cultivo de queratinocitos a partir de una biopsia - Modificación genética de los queratinocitos mediante infección con un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana - Cultivo de los queratinocitos modificados genéticamente hasta confluencia - Selección de los queratinocitos modificados genéticamente mediante un gen marcador - Sembrado de los queratinocitos seleccionados sobre la dermis artificial obtenida tras las tres primeras etapas.

PIEL ARTIFICIAL AUTÓLOGA SECRETORA DE LEPTINA Y MÉTODO DE OBTENCIÓN

La presente invención se refiere a una piel artificial utilizable para el tratamiento de las patologías causadas por una deficiencia permanente de la hormona proteica leptina.

Antecedentes de la invención

La Leptina es una hormona proteica esencial secretada mayoritariamente por los adipocitos encargada de regular tanto la ingesta como la función neuroendócrina a través de receptores hipotalámicos. Se han recogido hasta el momento, además, datos experimentales que evidencian un claro efecto de la leptina sobre la función celular actuando directamente sobre tejidos periféricos entre los que se incluyen el páncreas endócrino, la glándula pituitaria, el ovario, el músculo esquelético e hígado. La leptina podría jugar también un papel clave en procesos relacionados con la angiogénesis y en la remodelación ósea.

La deficiencia congénita de leptina ha sido identificada como el agente etiológico de una patología, de baja incidencia en la población, que cursa con la aparición temprana de una obesidad severa (Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C., Earley, A., Barnett, A., Prins, J. And O'Rahilly S. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903-908). Niveles bajos de leptina circulante se han observado también en pacientes afectados por distintas formas de diabetes lipoatrófica generalizada. Los pacientes afectados por esta enfermedad presentan una importante involución del tejido adiposo (fuente de la hormona) así como hiperglucemia y una resistencia severa a la insulina. Otras manifestaciones clínicas de esta patología incluyen la aparición de un síndrome anabólico caracterizado por organomegalia y cardiomiopatía hipertrófica (Pardini, V.C., Victoria, I.M., Rocha, S.M., Andrade, D.G., Rocha, A.M., Pieroni F.B., Milagres G., Purisch, S. and Velho, G. (1998) Leptin levels, beta-cell function, and insulin sensitivity in families with congenital and acquired generalized lipotropic diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, 503-508).

Esta última es la principal causa de muerte entre los pacientes afectados de diabetes lipodistrófica generalizada. La administración de leptina ha demostrado ser capaz de incrementar el metabolismo glucídico y restablecer la sensibilidad a la insulina en dos modelos animales de lipodistrofia congénita

generalizada con lo que queda establecido el papel crítico de la hormona en la fisiopatología de estos desordenes. Actualmente se están llevando a cabo distintos estudios clínicos en los que se trata a pacientes afectados tanto por deficiencia congénita de la hormona (Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A. and O'Rahilly S. (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341, 879-884) como a pacientes que sufren de diabetes lipodistrófica con inyecciones diarias de leptina recombinante. Los resultados que se están obteniendo son muy alentadores y subrayan el potencial terapéutico de leptina para el tratamiento de dichas patologías.

La terapia génica sistémica consiste en una intervención médica en la que células del propio paciente, o de otra fuente apropiada, son modificadas genéticamente para tratar o curar cualquier patología, independientemente de su etiología, derivada de una deficiencia en los niveles circulantes de una proteína determinada. Por tanto se puede considerar a la terapia génica sistémica como un método de producción y suministro *in situ* de proteínas. En el caso de enfermedades en las que la proteína debe ser administrada durante toda la vida del paciente, es necesario asegurar el mantenimiento tanto de la funcionalidad del gen incorporado como la supervivencia de la célula diana de la modificación genética. Los enfoques actualmente disponibles para una terapia génica sistémica y permanente hacen uso de vectores virales del tipo de adenovirus y AAV en células normalmente quiescentes tales como hepatocitos y músculo esquelético. La administración en estos casos es *in vivo*, es decir, el vector viral se inyecta directamente en el tejido o en el torrente sanguíneo. Dichas aproximaciones tienen serias limitaciones que restringen su aplicabilidad terapéutica., tales como la posibilidad de generar respuestas inmunes no deseadas (adenovirus), una capacidad muy limitada de clonación en el vector viral (virus asociados a adenovirus: AAV) o la dificultad para acceder al tejido modificado genéticamente en caso de una reacción adversa al gen introducido

El documento de patente ES 2 106 891 describe una técnica que utiliza células transfectadas con un ADN exógeno que codifica una proteína terapéutica. La información genética se transfiere por métodos no virales del tipo: electroporación, microinyección o recombinación homóloga, pero estos métodos son mucho menos eficientes que la utilización de vectores retrovirales. Esto es particularmente cierto al trabajar con la piel, en donde es necesario alcanzar

porcentajes altos de células modificadas genéticamente para asegurar la transferencia también a las células madre epidérmicas. La obtención de células madre epidérmicas modificadas es el paso obligado cuando se trata de generar en el paciente una producción permanente, a partir de la piel, de la proteína terapéutica. Hasta el momento, la modificación genética de células madre epidérmicas ha sido conseguida únicamente con el empleo de vectores retrovirales.

La piel representa un sistema exportador de proteínas exógenas muy atractivo (Fenjves, E.S., Smith, J., Zaradic, S. and Taichman LB. (1994) Systemic delivery of secreted protein by grafts of epidermal keratinocytes: prospects for keratinocyte gene therapy. *Hum Gene Ther.* 5, 1241-1248). Además, en la piel del propio paciente existen células madre (*stem*) epiteliales cuya manipulación genética *ex vivo* (expresión de la proteína deficiente) y posterior reimplantación asegurarían la regeneración en el paciente de su propia piel modificada, ahora secretora de la proteína terapéutica, cuya producción se mantendría durante toda la vida (De Luca, M. and Pellegrini, G. (1997) The importance of epidermal stem cells in keratinocyte-mediated gene therapy. *Gene Therapy* 4, 381-383). Las células epiteliales de la piel, incluidas las células madre o *stem*, se pueden aislar, cultivar, y modificar genéticamente empleando vectores retrovirales así como trasplantar nuevamente al paciente. El epitelio regenerado a partir de una célula madre modificada genéticamente daría como resultado una piel que expresa el factor de forma consistente en todos sus estratos y por tiempo ilimitado. Por último la piel es nuestra cobertura más externa por tanto representa un órgano que puede monitorizarse clínicamente así como retirarse de forma poco traumática en caso de efectos adversos. Resultaría por tanto muy valioso disponer de un método en el que la producción y suministro *in vivo* de leptina se lleve a cabo a partir de un trasplante autólogo de queratinocitos que incluyese células madre epiteliales modificadas genéticamente, secretoras de la proteína, para el tratamiento/curación de enfermedades de cursen con niveles deficientes de leptina.

En los documentos de patente P9701533 y P200100494 se describen dos métodos para la preparación de pieles artificiales, en las que los queratinocitos se cultivan sobre una matriz dérmica de fibrina, obtenida por bioprecipitado o directamente del plasma, resultando ser la matriz de fibrina un sustrato óptimo para la proliferación de los queratinocitos. La proliferación (amplificación de los

queratinocitos) es un paso crítico cuando se pretende emplear esta piel para el tratamiento de grandes quemados, pero no lo es en el caso de terapia génica. Aquí lo importante es que la fibrina mantiene todas las propiedades de la célula madre modificadas genéticamente, asegurando la reimplantación de las células madre funcionales que perpetuarán la producción de la proteína terapéutica. La utilización de un tipo de piel artificial en el caso que nos ocupa aprovecha fundamentalmente la capacidad de la fibrina de mantener en estado funcional las células madres epidérmicas alteradas genéticamente, en lugar de buscar grandes expansiones de biopsia autóloga.

El objetivo de la invención es, en consecuencia, el disponer de una piel artificial autóloga con capacidad de secretar y mantener *in vivo*, tras un trasplante, niveles terapéuticos de leptina que actúen, en el individuo receptor de dicho trasplante, como fuente alternativa de la hormona perdida, perpetuándose el efecto por el resto de la vida del paciente.

Descripción de la invención

La piel artificial autóloga utilizada en la presente invención está constituida por un componente dérmico y un componente epidérmico al que se le ha transferido el gen codificante para leptina. Un aspecto básico de esta invención consiste en el desarrollo de un procedimiento eficaz para la obtención y mantenimiento *in vivo* de células madre epidérmicas modificadas genéticamente. Este procedimiento consiste en la transferencia eficiente (>50% células transfectadas) del gen codificante para la leptina mediante el empleo de un vector retroviral seguido de un enriquecimiento del cultivo en células que producen la proteína terapéutica y de una recuperación del cultivo enriquecido en una matriz de fibrina y fibroblastos que protege a las células madre epidérmicas de una posible diferenciación y pérdida de sus propiedades. La incorporación, en la piel artificial a trasplantar, de células madre epidérmicas secretoras de leptina asegura una corrección permanente del defecto con una única intervención.

Breve descripción de las figuras

Para complementar la descripción que antecede y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se va a realizar una descripción detallada de una realización preferida, en base a un juego de dibujos que se acompañan a esta memoria descriptiva y en donde, con carácter meramente orientativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1 muestra el efecto del trasplante de piel humana secretora de leptina sobre los niveles de glucemia en ratones ob/ob.

La figura 2 muestra el efecto del trasplante de piel humana secretora de leptina sobre la ingesta diaria en ratones ob/ob.

5 La figura 3 muestra el efecto del trasplante de piel humana secretora de leptina sobre el peso corporal en ratones ob/ob.

La figura 4 muestra el efecto del trasplante de piel humana secretora de leptina sobre los niveles de leptina en ratones ob/ob.

Descripción detallada de una realización preferida

10 La realización que se describe se refiere al desarrollo de un método para el tratamiento de patologías caracterizadas por una deficiencia permanente de la hormona proteica leptina. El método consiste en el trasplante de una piel artificial autóloga que actúe, en el individuo receptor de dicho trasplante, como fuente alternativa de la hormona perdida y que ese efecto se perpetúe por el resto de la
15 vida del paciente.

La obtención del principal componente de la piel artificial, queratinocitos modificados genéticamente para producir y secretar leptina, se describe a continuación.

Los queratinocitos se obtienen a partir de una biopsia de piel por incubación
20 con la enzima tripsina. Una vez aislados se siembran sobre células 3T3-J2 o Swiss 3T3 letalmente irradiadas. La transducción viral se lleva a cabo sobre colonias de queratinocitos de 8 a 16 células del primer pase de un cultivo primario. Los queratinocitos se incuban entonces bien con sobrenadantes retrovirales generados por transfección transitoria en la línea 293T o a partir de
25 una productora estable como por ejemplo la línea PA317 o la línea PG13. La infección con sobrenadantes retrovirales generados a partir de las líneas 293T, PG13 o PA317 se lleva a cabo en dos días consecutivos en cada uno de los cuales las células son expuestas a dos ciclos de infecciones. La modificación genética se puede realizar también por co-cultivo con las líneas PG13 o PA317
30 previa irradiación letal de las mismas.

La modificación genética de los queratinocitos, comprende las siguientes etapas:

1. Primer ciclo de modificación genética que, partiendo de colonias con un número de células entre 8 y 16 del cultivo de queratinocitos obtenido a
35 partir de la biopsia de piel, y sembrados sobre la línea celular 3T3-J2 o

Swiss 3T3 letalmente irradiadas, comprende una centrifugación a 3.500 r.p.m. y 30°C durante una hora en presencia de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 60 µg/ml. A este primer contacto de los queratinocitos con el retrovirus le sigue una incubación durante un tiempo de 4 horas en un medio fresco exento de retrovirus. Sorprendentemente ni la centrifugación a velocidades mayores de las habituales ni las altas concentraciones de polibreno empleadas en el primer ciclo alteraron la viabilidad o la funcionalidad de las células madre epidérmicas.

2. Segundo ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 2 horas de los queratinocitos en presencia de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 µg/ml, cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus e incubación durante un tiempo de 16 horas.
3. Tercer ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 4 horas de los queratinocitos en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 µg/ml, cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus e incubación durante un tiempo de 4 horas,
4. Cuarto ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 4 horas de los queratinocitos en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 µg/ml, y cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus.

Entre los vectores virales se pueden emplear vectores que además de portar una secuencia de ADN que codifique y exprese leptina porten también una secuencia que codifique para un gen marcador (por ejemplo: pLZRS-leptin-IRES-EGFP en donde el marcador es el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) o pLZRS-leptin-IRES-GHR en donde el marcador es el receptor de la hormona de crecimiento (GHR).

Cuando los queratinocitos alcanzan el 60-80% de confluencia, se despegan de los frascos de cultivos por tripsinización, se resuspenden en

PBS/2% suero fetal bovino, se analizan por citometría de flujo y se seleccionan en base a por ejemplo la fluorescencia de la proteína verde. Esta manipulación no altera la funcionalidad de las células madre epidérmicas comprendida entre la población transducida por el virus. La población así purificada formada únicamente por células que recibieron el gen marcador y el gen codificante para la leptina son sembradas ahora sobre una matriz de fibrina como la descrita en el documento de patente ES 200100494.

Ejemplo 1.

Los modelos animales deficientes en leptina constituyen herramientas de gran valor para el seguimiento de los efectos inducidos por diversos protocolos tales como la administración de la proteína recombinante o de otros posibles agonistas. Para el seguimiento de la presente invención, se llevaron a cabo trasplantes de pieles artificiales humanas secretoras de leptina en ratones ob/ob inmunosuprimidos o inmunodeficientes capaces de aceptar el xenotrasplante. El ratón ob/ob es un ratón mutante deficiente en leptina (Coleman, D.L. (1978) *Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. Diabetologia* 14, 141-148). En estos animales la falta de leptina conduce a un fenotipo caracterizado por obesidad severa, debida a un incremento importante de la ingesta diaria, hiperglucemia con hipeinsulinemia (diabetes tipo II) e infertilidad.

Sobre una población de ratones ob/ob deficientes en leptina se aplicó un trasplante de piel artificial realizado de acuerdo con la presente invención. Los niveles circulantes de glucosa y leptina así como la ingesta diaria y el peso se monitorizaron en relación a una población testigo que recibió un trasplante de piel no modificada genéticamente, observándose la normalización progresiva de los mismos y su mantenimiento en el tiempo, tal como se muestra en las figuras 1 a 4.

30

35

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de una piel artificial autóloga secretora de leptina, caracterizado por comprender las siguientes etapas:
 - 5 • obtención de plasma con plaquetas mediante centrifugación ligera de sangre total de un humano y congelación subsiguiente
 - cultivo de células dérmicas a partir de una biopsia de piel por métodos conocidos
 - 10 • gelificación del plasma con plaquetas, previamente descongelado, mediante la adición de sales de calcio para obtener una matriz de fibrina, sembrando las células dérmicas cultivadas en el interior de la matriz de fibrina
 - cultivo de queratinocitos a partir de una biopsia de piel por métodos conocidos
 - 15 • modificación genética de los queratinocitos; de tal manera que los mismos sean susceptibles de expresar leptina de forma permanente
 - cultivo de los queratinocitos genéticamente modificados hasta que están confluentes
 - selección de los queratinocitos modificados genéticamente en base a un gen marcador
 - 20 • sembrado de los queratinocitos seleccionados sobre la dermis artificial obtenida tras las tres primeras etapas descritas.
2. Método de obtención de una piel artificial autóloga productora de leptina, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la modificación genética de los queratinocitos, comprende las siguientes etapas:
 - 25 • primer ciclo de modificación genética que, partiendo de colonias con un número de células entre 8 y 16 del cultivo de queratinocitos obtenido a partir de la biopsia de piel, comprende una centrifugación a 3.500 r.p.m. y 30°C durante una hora en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 60 µg/ml, cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus, e incubación durante un tiempo de 4 horas,
 - 30 • segundo ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 2 horas de los queratinocitos en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una
 - 35

solución de polibreno de concentración 8 $\mu\text{g/ml}$, cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus e incubación durante un tiempo de 16 horas,

- 5 • tercer ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 4 horas de los queratinocitos en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 $\mu\text{g/ml}$, cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus e incubación durante un tiempo de 4 horas,
- 10 • cuarto ciclo de modificación genética, que comprende una incubación durante 4 horas de los queratinocitos en unión de un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana y en presencia de una solución de polibreno de concentración 8 $\mu\text{g/ml}$, y cambio del medio de cultivo por otro exento de retrovirus.
- 15 3. Piel artificial autóloga secretora de leptina, caracterizada por incorporar queratinocitos genéticamente modificados susceptibles de expresar leptina de forma permanente.
- 20 4. Piel artificial autóloga secretora de leptina, caracterizada por incorporar queratinocitos modificados genéticamente mediante su infección con un vector retroviral portador del gen codificante de la leptina humana.

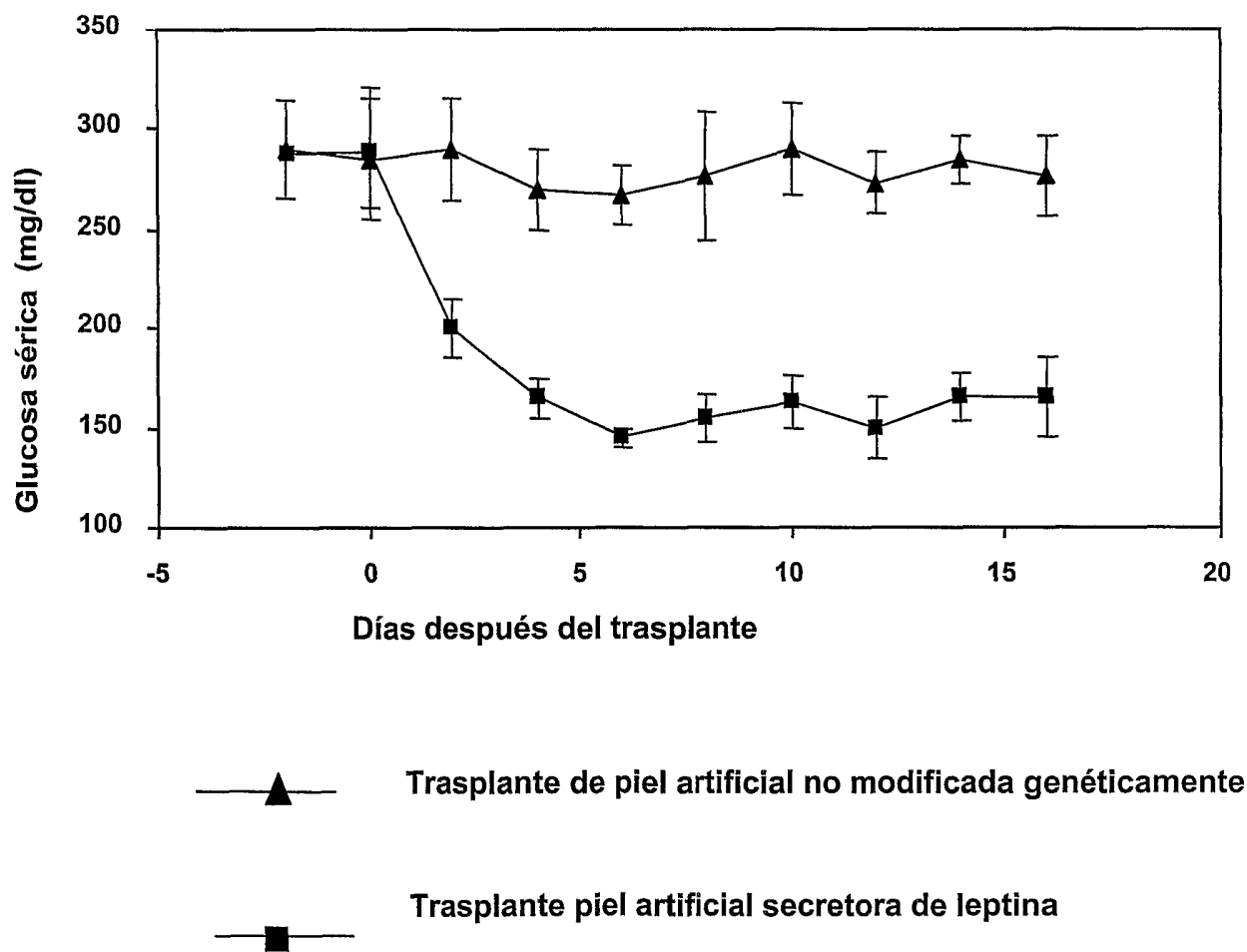


FIG. 1

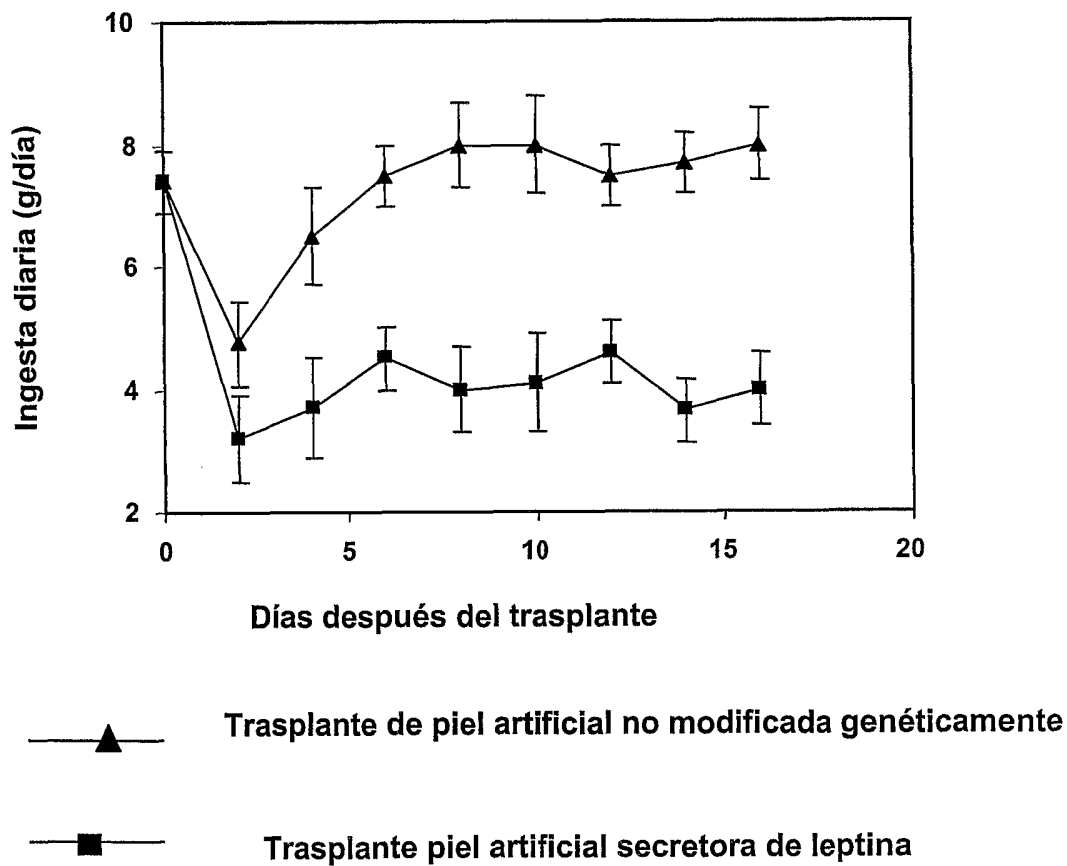
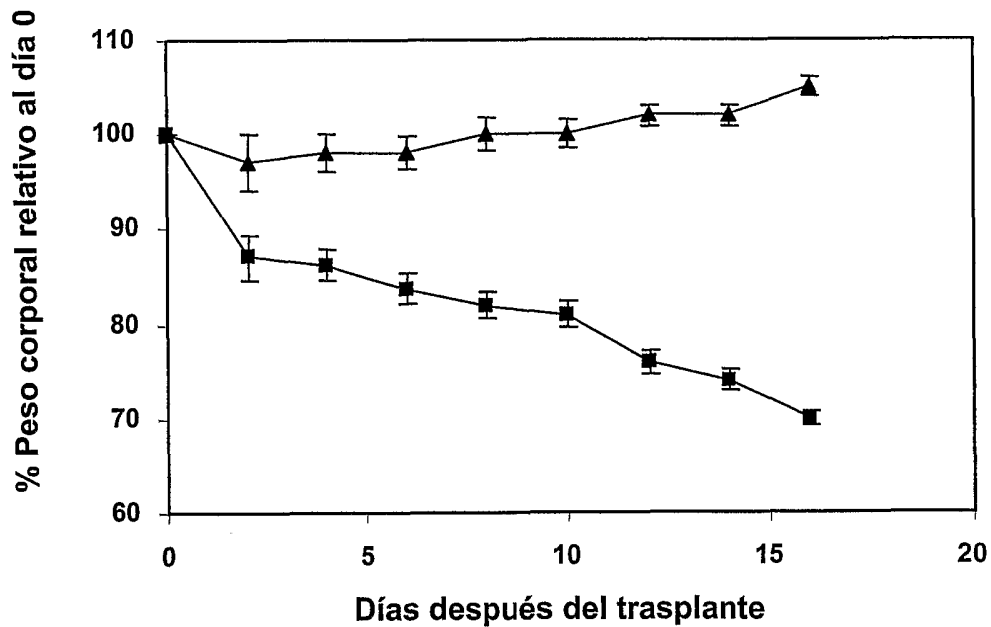


FIG. 2

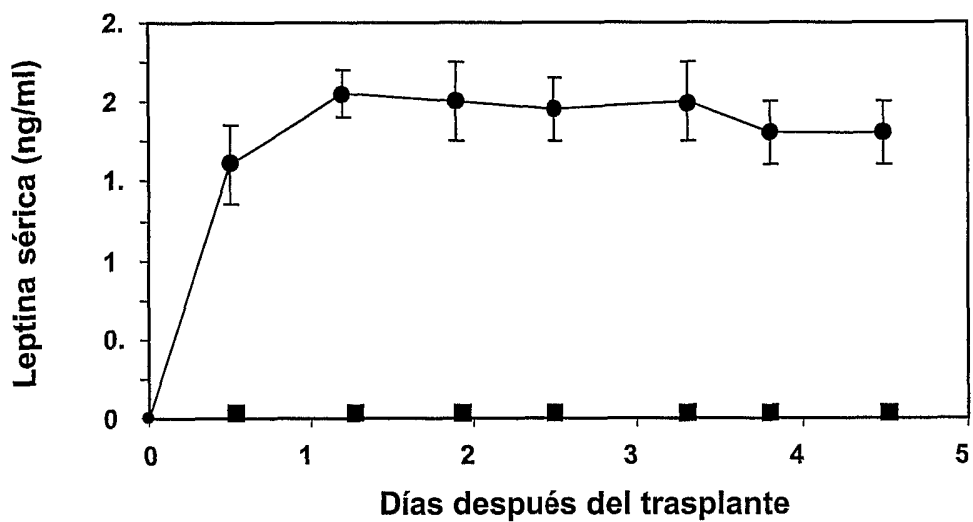
3/4



—▲— Trasplante de piel artificial no modificada genéticamente

—■— Trasplante piel artificial secretora de leptina

FIG. 3



- Trasplante piel artificial no modificada genéticamente
- Trasplante piel artificial secretora de leptina

FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 02/00320

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</p> <p>IPC⁷ A61K48/00, C12N15/16, 5/06, A61F2/10, A61P5/00</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																	
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p>IPC⁷ A61K C12N A61F A61P</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p> <p>CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA</p>																	
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>LARCHER, F. et al.: "A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin targeted keratinocyte grafts", July 2001, FASEB Journal, vol. 15 (9), pp.: 1529-1538, ISSN 0892-6638, the whole document.</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 87/00201 A1 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15.01.1987, the whole document, particularly claim 30</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>ES 2132027 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1999, the whole document, particularly claim 7</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6001816 A (MORSY M.A. et al.) 14.12.1999, the whole document,</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	LARCHER, F. et al.: "A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin targeted keratinocyte grafts", July 2001, FASEB Journal, vol. 15 (9), pp.: 1529-1538, ISSN 0892-6638, the whole document.	1-4	X	WO 87/00201 A1 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15.01.1987, the whole document, particularly claim 30	1-4	X	ES 2132027 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1999, the whole document, particularly claim 7	1-4	A	US 6001816 A (MORSY M.A. et al.) 14.12.1999, the whole document,	1-4
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	LARCHER, F. et al.: "A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin targeted keratinocyte grafts", July 2001, FASEB Journal, vol. 15 (9), pp.: 1529-1538, ISSN 0892-6638, the whole document.	1-4															
X	WO 87/00201 A1 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15.01.1987, the whole document, particularly claim 30	1-4															
X	ES 2132027 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1999, the whole document, particularly claim 7	1-4															
A	US 6001816 A (MORSY M.A. et al.) 14.12.1999, the whole document,	1-4															
<p><input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p>																	
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>																	
<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p>16th October 2002 (16.10.2002)</p>		<p>Date of mailing of the international search report</p> <p>24th October 2002 (24.10.2002)</p>															
<p>Name and mailing address of the ISA/</p> <p>S.P.T.O.</p>		<p>Authorized officer</p>															
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 02/00320

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 87/00201 A	15.01.1987	AU 6131086 A EP 0228458 A JP 63500492T T DE 3681787G G IL 79289 A CA 1339962 C	30.01.1987 15.07.1987 25.02.1988 07.11.1991 15.01.1992 21.07.1998
- ES 2132027 A1	- 01.08.1999	- NONE	- NONE
- US 6001816 A	- 14.12.1999	- NONE	- NONE

<p>A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD</p> <p>CIP⁷ A61K48/00, C12N15/16, 5/06, A61F2/10, A61P5/00 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.</p>																					
<p>B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA</p> <p>Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)</p> <p>CIP⁷ A61K C12N A61F A61P</p> <p>Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda</p> <p>Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)</p> <p>CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA</p>																					
<p>C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Categoría*</th> <th>Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes</th> <th>Relevante para las reivindicaciones n°</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>LARCHER, F. et al.: "A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin targeted keratinocyte grafts", julio 2001, FASEB Journal, vol. 15 (9), pp.: 1529-1538, ISSN 0892-6638, todo el documento</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 87/00201 A1 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15.01.1987, todo el documento, en particular reiv. 30</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>ES 2132027 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1999, todo el documento, en particular reiv. 7</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A.</td> <td>US 6001816 A (MORSY M.A. et al.) 14.12.1999, todo el documento</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos <input checked="" type="checkbox"/> Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo</p> <p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p> <p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p> <table border="1"> <tr> <td> Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 16 Octubre 2002 (16.10.2002) </td> <td> Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 24 OCT 2002 24.10.02 </td> </tr> <tr> <td> Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. n° de fax +34 91 3495304 </td> <td> Funcionario autorizado Alfonso Maquedano n° de teléfono + 34 91 3495474 </td> </tr> </table>			Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°	X	LARCHER, F. et al.: "A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin targeted keratinocyte grafts", julio 2001, FASEB Journal, vol. 15 (9), pp.: 1529-1538, ISSN 0892-6638, todo el documento	1-4	X	WO 87/00201 A1 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15.01.1987, todo el documento, en particular reiv. 30	1-4	X	ES 2132027 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1999, todo el documento, en particular reiv. 7	1-4	A.	US 6001816 A (MORSY M.A. et al.) 14.12.1999, todo el documento	1-4	Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 16 Octubre 2002 (16.10.2002)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 24 OCT 2002 24.10.02	Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. n° de fax +34 91 3495304	Funcionario autorizado Alfonso Maquedano n° de teléfono + 34 91 3495474
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°																			
X	LARCHER, F. et al.: "A cutaneous gene therapy approach to human leptin deficiencies: correction of the murine ob/ob phenotype using leptin targeted keratinocyte grafts", julio 2001, FASEB Journal, vol. 15 (9), pp.: 1529-1538, ISSN 0892-6638, todo el documento	1-4																			
X	WO 87/00201 A1 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15.01.1987, todo el documento, en particular reiv. 30	1-4																			
X	ES 2132027 A1 (CENTRO COMUNITARIO DE TRANSFUSIÓN DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS) 01.08.1999, todo el documento, en particular reiv. 7	1-4																			
A.	US 6001816 A (MORSY M.A. et al.) 14.12.1999, todo el documento	1-4																			
Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 16 Octubre 2002 (16.10.2002)	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 24 OCT 2002 24.10.02																				
Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M. C/Panamá 1, 28071 Madrid, España. n° de fax +34 91 3495304	Funcionario autorizado Alfonso Maquedano n° de teléfono + 34 91 3495474																				

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
 Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 02/00320

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 87/00201 A	15.01.1987	AU 6131086 A EP 0228458 A JP 63500492T T DE 3681787G G IL 79289 A CA 1339962 C	30.01.1987 15.07.1987 25.02.1988 07.11.1991 15.01.1992 21.07.1998
-	-	-	-
ES 2132027 A1	01.08.1999	NINGUNO	NINGUNO
-	-	-	-
US 6001816 A	14.12.1999	NINGUNO	NINGUNO
-	-	-	-