

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 989 554**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/26 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/60 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2017 E 17179732 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3326660**

(54) Título: **Sustituto de piel artificial biodegradable y biocompatible listo para uso y un método de preparación del mismo**

(30) Prioridad:

28.11.2016 IN 201611040491

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

27.11.2024

(73) Titular/es:

**AYU MEDICAL LIMITED (100.0%)
The Black Church, St. Mary's Place
Dublin 7, IE**

(72) Inventor/es:

**DATT, RAJAN;
SRIVASTAVA, SUPRIYA;
PANDEY, SIDDHARTH y
SHRIVASTAVA, PALLAVI**

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 989 554 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

Sustituto de piel artificial biodegradable y biocompatible listo para uso y un método de preparación del mismo

Campo de la invención:

La presente invención se relaciona con el campo de la manipulación genética de tejidos.

5 Más particularmente, la invención se relaciona con un método *in vitro* para inducir a las células a producir una matriz extracelular, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Más particularmente, la invención se relaciona con una matriz extracelular viva, que tiene propiedades similares a los tejidos y puede utilizarse para la cicatrización de heridas, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10 Más particularmente, la invención se relaciona con una matriz extracelular para el tratamiento de heridas por quemaduras, úlceras de pie diabético y otras heridas crónicas, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Antecedentes de la invención

15 El campo de la manipulación genética de tejidos combina métodos de biomanipulación genética con los principios de las ciencias de la vida para comprender las relaciones estructurales y funcionales en los tejidos normales y patológicos de los mamíferos. El objetivo de la manipulación genética de tejidos es el desarrollo y aplicación final de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar las funciones de los tejidos. Así, mediante la manipulación genética de tejidos, es posible diseñar y fabricar un constructo de tejido obtenido por biomanipulación genética *in vitro*. Los constructos de tejidos de biomanipulación genética incluyen células que 20 se asocian a tejidos humanos y a matrices/armazones naturales. El nuevo tejido obtenido por biomanipulación genética debe ser funcional cuando se injerta en un huésped, e incorporarse permanentemente en el organismo del huésped o biorremodelarse progresivamente con células del paciente receptor. La fabricación de un equivalente tisular sin un miembro de soporte o armazón plantea retos científicos a la hora de crear el nuevo tejido obtenido por biomanipulación genética.

25 El objetivo principal en el tratamiento de las heridas es lograr su cierre, para lo cual se han desarrollado varias modalidades. Uno de los problemas persistentes en el tratamiento de grandes heridas, como quemaduras, es la disponibilidad de piel de cobertura para reparar las zonas dañadas.

El tratamiento adoptado depende del tipo de herida y de la metodología del médico. Las heridas postoperatorias suelen clasificarse en intención primaria (cierre quirúrgico), intención secundaria (herida que se deja abierta para que se cierre mediante un proceso reparador) y cierre terciario (herida que se deja abierta, normalmente debido a una infección, y se cierra quirúrgicamente más adelante). En primera intención, el médico aproxima los bordes de la herida, lo que da como resultado una formación mínima de cicatriz. El tratamiento de heridas por segunda intención suele producirse cuando existen, por ejemplo, (a) heridas abiertas con bordes lacerados, (b) grandes defectos que no pueden cubrirse con injertos, (c) alteraciones tróficas extensas como úlceras de pierna, (d) heridas muy supurativas, (e) heridas entremezcladas con cuerpos extraños, (f) heridas infectadas que han sufrido un cierre primario, y (g) heridas que cicatrizan mejor estéticamente y funcionalmente como resultado de contracción en lugar de sutura, por ejemplo, heridas en la yema de los dedos. En el tratamiento de heridas por segunda intención, la pérdida de tejido debe compensarse con la formación de nuevo tejido conectivo y la contracción de la herida. La formación de cicatrices bajo tales condiciones puede dar lugar a menudo a una cicatriz cosmética y funcionalmente inferior. En estas situaciones, el sellado del epitelio a través de la herida 30 no se produce rápidamente, ya que las células tienen que crecer hacia abajo y extenderse progresivamente a través de la herida en la unión del tejido viable y no viable. También hay más formación de tejido de granulación que crece desde la base de la herida para llenar el defecto. Esto va acompañado de la contracción de la herida, con lo que el resultado final es un epitelio intacto (regeneración). Sin embargo, una mayor distorsión 35 tisular y una cicatriz extensa y cosméticamente insatisfactoria suelen causar un deterioro de la función (reparación) (Goepel JR. "Responses to cellular injury," In: Underwood JCE (ed). General and Systemic Pathology, Second Edition. London, UK, Churchill Livingstone, 1996, pp 121122.). La reparación indica el proceso que experimenta un tejido para regenerarse/reformarse completamente. Los queratinocitos alogénicos 40 utilizados en esta cubierta para heridas de la presente invención están destinados a reparar la piel dañada 45 conduciendo a su regeneración.

50 En la piel de los mamíferos, este tipo de lesión tisular inicia una serie compleja pero ordenada de acontecimientos bioquímicos y celulares influenciados por un gran número de mediadores químicos, que conducen a la hemostasia, cicatrización de la herida y la eventual generación del tejido cicatricial. El proceso de reparación puede dividirse arbitrariamente en tres fases principales superpuestas e interrelacionadas: inflamación; formación de nuevo tejido (proliferación); y formación y remodelación de la matriz. (Clark RAF. Wound repair; overview and general considerations. In: Clark RAF (ed). The Molecular and Cellular Biology of

Wound Repair, Second Edition. London, UK, Plenum Press, 1996, pp350). Cabe destacar que no existe una demarcación clara entre las fases de la cicatrización de heridas, ya que el proceso de reparación tisular es un fenómeno continuo. La cicatrización de las heridas de la piel es, por tanto, un proceso biológico complejo que requiere la restauración de la cubierta mediante la reepitelización y la restauración del soporte por parte de los fibroblastos dérmicos. La reepitelización es el resultado de la migración y proliferación de queratinocitos. La 5 rata de reepitelización es mayor en las heridas superficiales que en las profundas, en donde las probabilidades de infección y formación de cicatrices son muy elevadas. Aunque el principal punto final de la cicatrización es el cierre de la herida, también es importante centrarse en la calidad de la cicatrización.

Los sustitutos cutáneos obtenidos por manipulación genética de tejidos constituyen un avance significativo en 10 el campo de la cicatrización de heridas. Estos se desarrollaron debido a limitaciones asociadas al uso de autoinjertos, incluida la creación de una zona donante, que corre el riesgo de desarrollar dolor, cicatrices, infección y/o cicatrización lenta, por ejemplo.

Antes del desarrollo de la piel obtenida por manipulación genética de tejidos, las únicas opciones disponibles 15 eran injertos de piel divididos o de espesor total, colgajos de tejido o transferencias de tejido libre. En las dos últimas décadas se han desarrollado sustitutos cutáneos obtenidos por manipulación genética de tejidos y su uso ha progresado a un ritmo muy rápido. La manipulación genética de tejidos fue definida en 1987 por el panel de biomanipulación genética de la National Science Foundation reunido en Washington, DC, Estados Unidos, como "la aplicación de los principios y métodos de manipulación genética y las ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función" En la actualidad, la 20 Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) ha aprobado el uso de productos de piel obtenidos por manipulación genética de tejidos y otros están en fase de pruebas y revisión reglamentaria. Los sustitutos cutáneos obtenidos por manipulación genética de tejidos ofrecen la promesa de sustituir tejidos sin necesidad de recurrir a una zona donante y pueden mejorar la cicatrización. La piel obtenida por manipulación genética de tejidos puede funcionar proporcionando en el lugar de la herida los materiales de matriz o las 25 células necesarias para el proceso de cicatrización. La piel obtenida por manipulación genética de tejidos se refiere a productos cutáneos fabricados principalmente con células, o materiales de matriz extracelular únicamente, o a una combinación de células y matrices.

Las fuentes celulares para la manipulación genética de tejidos se dividen en tres categorías: células autólogas 30 (del paciente); células alogénicas (de un donante humano, pero no inmunológicamente idénticas); y células xenogénicas (donante de una especie diferente). Cada uno de estos orígenes puede delimitarse a su vez en células madre adultas o embrionarias, o células "diferenciadas" obtenidas a partir de tejidos, donde la población celular está formada por una mezcla de células maduradas de forma diferente que incluye células madre y progenitoras poco frecuentes. Hasta la fecha, las terapias disponibles dependen de toda la mezcla de células, o de la separación o enriquecimiento de las células madre. Aunque las transferencias de tejidos autólogos 35 pueden ser muy eficaces para asegurar la cicatrización de las heridas, estos procedimientos (por ejemplo, injertos y colgajos) son invasivos, dolorosos y de alto coste, y no están al alcance de muchos profesionales del cuidado de heridas. Los injertos de piel autóloga, aunque tienen éxito, presentan limitaciones debido a la limitación de las zonas donantes, así como a la creación de nuevas heridas en la zona donante. Para superar este problema, se han utilizado varios tipos de sustitutos cutáneos, como los injertos cutáneos alogénicos o 40 xenogénicos, con distintos grados de éxito. Las limitaciones de este tratamiento están relacionadas con la esterilidad, dificultad de manipulación, riesgo de transmisión viral y rechazo inmunitario por parte del huésped.

Las terapias celulares para heridas, como los sustitutos celulares de la piel, tienen el potencial de reducir la contracción de la herida e influir en la naturaleza del tejido cicatrizado final. Existen informes que indican otros beneficios de la terapia de sustitución cutánea además del cierre precoz de la herida. Las propiedades de la 45 herida cicatrizada que más se asemejan a las de la piel normal no lesionada (Gohari et al., "Evaluation of tissue engineered skin (human skin substitute) and secondary intention healing in the treatment of full thickness wounds after Mohs micrographic or excisional surgery," Dermatol Surg 28:110714, 2002.) Se cree que las células aplicadas a la superficie de la herida son "inteligentes" y bañarán el lecho de la herida con cócteles equilibrados de dichos mediadores apropiados para la fisiología particular del entorno de la herida que se detecta. Por lo tanto, las células son más ventajosas que la terapia proporcionada por la aplicación exógena 50 de factores de crecimiento. (Krishnamoorthy et al. "Specific growth factors and the healing of chronic wounds," J Wound Care 10:1738, 2001). Por ejemplo, la incubación de células derivadas de biopsias de úlceras venosas en medio condicionado sobrenadante de cultivo celular de fibroblastos humanos induce un aumento muy significativo de la proliferación de células cutáneas, y este efecto se ha correlacionado con los niveles de varias 55 citocinas (Martin et al. "Effect of human fibroblast derived dermis on expansion of tissue from venous leg ulcers," Wound Repair Regen 11:2926, 2003.)

Se ha demostrado que un sustituto de la piel obtenido por biomanipulación genética actúa como un sistema interactivo de administración de "fármacos" (Shen et al. "Innovative therapies in wound healing," J Cutan Med Surg 2003 7(1) 217224). Werner et al. y Mansbridge et al. han informado que la viabilidad y actividad metabólica 60 del componente celular de un sustituto celular cutáneo es esencial para la eficiencia terapéutica. Estos grupos han propuesto que esto es debido a la necesidad de expresión continua de citoquinas en el lecho de la herida después de la aplicación. (Werner et al. "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines," Physiol

Rev 83:83570, 2003 Mansbridge et al. "Three-dimensional fibroblast culture implant for the treatment of diabetic foot ulcers: metabolic activity and therapeutic range," *Tissue Engineering* 4:40314, 1998). Las mediciones de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) secretadas por la epidermis y la dermis del LSE (equivalente de piel viva) demuestran que las distintas capas de la piel creada mediante biomanipulación genética perciben su entorno y secretan MMP en cantidades y proporciones diferentes en función de su entorno. (Osborne et al. "Epidermal-dermal interactions regulate gelatinase activity in Apligraf, a tissue engineered human skin equivalent," *Br J Dermatol* 146:2631, 2002.) Apligraf™ (Patente de Estados Unidos número 4,485,096) se fabrica a partir de fibroblastos humanos cultivados en una membrana semipermeable con colágeno bovino de tipo I, a los que luego se superponen queratinocitos, que se cultivan hasta que se forma una capa confluente. Los queratinocitos y los fibroblastos dérmicos se derivan del prepucio neonatal y se propagan en cultivo. Posteriormente, los queratinocitos que recubren la epidermis se exponen a una interface aire-líquido para promover la formación de un estrato córneo. El proceso tarda 20 días en estar listo para su aplicación en la herida. Los sustitutos epidérmicos preparados a partir de queratinocitos obtenidos de la muestra de piel del futuro receptor (autoinjertos) han demostrado tener la capacidad de reconstituir una epidermis cuando se administran en una zona con pérdida de piel, como el lecho extirpado de una escara por quemadura. (O' Conner et al. "Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells," *Lancet* 1:7578, 1981) o de otra persona (aloinjertos) (Madden et al. "Grafting of cultured allogeneic epidermis on second and third degree burn wounds on 26 patients," *J Trauma* 26(11):95562, 1986.) Tras los trabajos pioneros de Rheinwald y Green. ("Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from cells," *Cell* 6:331344, 1975), ahora es posible propagar en serie queratinocitos humanos normales *in vitro*. Estos queratinocitos pueden reconstituir un epitelio escamoso estratificado, que mantiene las características bioquímicas, morfológicas y funcionales de una epidermis nativa (Compton et al. "Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study," *Lab. Invest.* 60:600612, 1989). Los métodos establecidos para el cultivo *in vitro* de injertos epiteliales requieren el crecimiento de células multicapa. Este procedimiento requiere un periodo de 34 semanas antes de que las películas estén listas para el trasplante. Sin embargo, el injerto de este tipo de láminas, que requiere mucho trabajo, ha corrido suertes dispares, con informes sobre eficiencias inferiores a las previstas (Desai et al. "Lack of longterm durability of cultured keratinocyte burn wound coverage: a case report," *J Burn Care Rehabil.* 12(6):5405, 1991). Los problemas relacionados con la falta de "toma" y de durabilidad a largo plazo, el tiempo necesario para la preparación de la película y el elevado coste de producción de dichos injertos, así como la dificultad de manipulación, han conducido al desarrollo de sistemas de administración alternativos para transferir queratinocitos al lecho de la herida.

Los autoinjertos epidérmicos cultivados (Epicel™) se han descrito como queratinocitos epidérmicos cultivados *in vitro* utilizando una capa alimentadora de fibroblastos murinos irradiados. Se requiere un mínimo de 2 a 3 semanas, desde el momento de la recolección de la biopsia hasta la administración de los injertos. Aunque estos autoinjertos epidérmicos cultivados proporcionan una cobertura permanente de la herida, menor necesidad de zonas donantes, rápida cobertura de la herida, alivio más rápido del dolor y mejor resultado funcional y estético. Sin embargo, las limitaciones de este injerto incluyen un retraso de 3 semanas para el cultivo del injerto, la falta de un componente dérmico y un coste elevado.

Los aloinjertos epidérmicos cultivados pueden realizarse en un proceso similar al de Epicel™, derivados de donantes alogénicos no relacionados, como el prepucio de un recién nacido. Como las células pueden cultivarse con antelación y almacenarse, están disponibles para injertos. No son comercialmente viables. Estos productos similares contienen células diferenciadas no proliferantes. Como resultado, proporcionan una cobertura sólo hasta su área limitada. Sin embargo, es necesario disponer de células proliferativas que, al migrar al lecho de la herida, sean capaces de proliferar y cubrir áreas mayores que las que proporciona la cubierta de la herida. La ventaja de utilizar aloinjertos epidérmicos cultivados es la disponibilidad inmediata del injerto. Las desventajas son que no sobreviven de forma permanente en el lecho de la herida y que existe la posibilidad de transmisión de enfermedades, que puede minimizarse con un cribado exhaustivo.

Integra®, un sustituto dérmico *in vitro*, es una piel artificial que consiste en una dermis artificial (matriz de colágeno bovino y condroitina 6-sulfato, un glicosaminoglicano derivado del tiburón) y una lámina de silicona desechable (epidermis artificial). Está aprobado para uso en quemaduras. La ventaja de utilizar esta dermis artificial es que permite que se desarrolle una neodermis. Sin embargo, la lámina de silicona desechable puede permitir la acumulación de exudado, lo que aumenta el riesgo de infección. Tampoco proporciona un componente epidérmico real; y la lámina de silicona debe retirarse quirúrgicamente y, en última instancia, sustituirse por un autoinjerto o aloinjerto.

Derma graft™, es un sustituto de la piel de manipulación genética tisular que comprende colágeno y glicosaminoglicanos como sustrato para queratinocitos autólogos cultivados como componente epidérmico, y sustrato de colágeno y glicosaminoglicanos inoculado con fibroblastos autólogos como componente dérmico. Sin embargo, la "toma" general fue de aproximadamente el 50 % (atribuida en parte a las proteasas en el entorno de la herida), lo que no es lo suficientemente exitoso como para convertirlo en un reemplazo de piel rutinariamente aceptable. La desventaja adicional de este sustituto de la piel es la necesidad de esperar de 3 a 4 semanas para producir los injertos cultivados.

Otro sustituto de la piel, previamente disponible como Transcyte™, comprende fibroblastos neonatales (alógenicos) que han sido cultivados y proliferan en fibras de nailon incrustadas en un silastic recubierto de colágeno porcino. Al cabo de 4 a 6 semanas se forma un "tejido" celular denso, que contiene altos niveles de proteínas de matriz humana secretadas, así como múltiples factores de crecimiento. Los fibroblastos se vuelven no viables por congelación después de sintetizar la matriz extracelular de colágeno y los factores de crecimiento. La patente de Estados Unidos número 6,790,455 describe una matriz biodegradable y/o bioabsorbible formada por electro hilado de fibras de material fibrilable biodegradable y/o bioabsorbible asociadas físicamente con células viables para contener y liberar las células a una tasa controlada. No se ha demostrado que esta tecnología sea eficaz para liberar queratinocitos o administrar como sustituto de la piel.

La patente estadounidense número 6,933,326 describe la matriz dérmica acelular alógenica no viva (comercializada como Alloderm®), que se fabrica cortando láminas de matriz tisular seca en tiras; criofracturando las tiras de matriz tisular seca a temperaturas criogénicas; y liofilizando las tiras para eliminar la humedad que puedan haber absorbido y obtener una matriz tisular acelular seca.

En pacientes con quemaduras graves, la escisión precoz de la herida y el injerto de piel desempeñan un papel crucial y han permitido reducir el tiempo de hospitalización, disminuir las complicaciones y aumentar la supervivencia. El tratamiento convencional de las heridas por quemaduras profundas o de espesor total se consigue utilizando injertos de piel de espesor dividido (STSG) como cobertura de la herida. Sin embargo, las desventajas asociadas a este método incluyen que causa morbilidad en la zona donante y que las zonas donantes son limitadas en las quemaduras extensas. Se han utilizado varios métodos para administrar queratinocitos altamente proliferativos. Una forma de disponer de células en el lugar de la herida es mediante el cultivo de queratinocitos en la superficie de membranas biodegradables que, al colocarse sobre la herida, liberarían las células al romperse. (Ronfard et al, "Use of human keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds," Burns 17(3): 1814, 1991). El segundo método consiste en la transferencia "al revés" de células cultivadas en membranas no biodegradables. (Wright KA et al. "Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full thickness burn injury," Burns 24(1):717, 1998). Los estudios realizados en animales demuestran la capacidad de los queratinocitos para migrar desde la membrana al lecho de la herida y reconstituir una epidermis intacta. Como alternativa, podría administrarse una suspensión de queratinocitos en el lugar de la herida después de incorporarlos al pegamento de fibrina (Kaiser et al. "Cultured Autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS allograft (preliminary clinical and histological report of a new technique)," Burns 20(I):239, 1994)

Ceccaldi et al. (Acta Biomater. 2014 Feb;10(2):901-911) y Fen et al. (Polymer International 2000; 49(12):1596-1599 divultan armazones a base de complejos polielectrolíticos adecuados para la manipulación genética tisular.

Por lo tanto, es muy importante proporcionar soluciones que puedan resolver los problemas anteriores de una manera innovadora. La presente invención pretende dar solución a los problemas mencionados anteriormente y proporciona una técnica de cultivo de células epidérmicas humanas en una capa proliferante y subconfluente sobre una membrana biocompatible, para formar láminas adecuadas para injertos.

Se puede hacer referencia a la Patente de los Estados Unidos 4,963,489 titulada "Three-dimensional cell and tissue culture system" de fecha 16.10.1990. Este documento se relaciona con un sistema de cultivo celular tridimensional que puede usarse para cultivar una variedad de células y tejidos diferentes *in vitro* durante períodos de tiempo prolongados. De acuerdo con este documento, las células derivadas de un tejido deseado se inoculan y se cultivan sobre una matriz de soporte estromal preestablecida. La matriz de soporte estromal comprende células estromales, como fibroblastos, cultivadas hasta la subconfluencia en una matriz tridimensional. Las células estromales también pueden incluir otras células que se encuentran en el tejido conjuntivo laxo, como células endoteliales, macrófagos/monocitos, adipocitos, pericitos, células reticulares que se encuentran en el estroma de la médula ósea, etc. La matriz estromal proporciona el soporte, factores de crecimiento y factores reguladores necesarios para sostener la proliferación activa a largo plazo de las células en cultivo. Cuando se cultivan en este sistema tridimensional, las células proliferantes maduran y se segregan adecuadamente para formar componentes de tejidos adultos análogos a los homólogos encontrados *in vivo*.

Se puede hacer referencia a la Patente de los Estados Unidos 5,882,521 titulada "Water-wettable chromatographic media for solid phase extraction" de fecha 16.03.1999. Un método para eliminar un soluto orgánico de una solución, que comprende poner en contacto la solución con un polímero formado por copolimerización de uno o más monómeros hidrófobos y uno o más monómeros hidrófilos, por lo que el soluto se adsorbe en el polímero. La solución puede comprender un disolvente polar como un disolvente orgánico polar o agua o un regulador acuoso. El monómero hidrófobo puede ser, por ejemplo, divinilbenceno. El monómero hidrófilo puede ser, por ejemplo, un monómero heterocíclico, como una vinilpiridina o una N-vinilpirrolidona.

Puede hacerse referencia a la Patente de los Estados Unidos 8,790,921 titulada "Alimentary protein-based scaffolds (APS) for wound healing, regenerative medicine and drug discovery" de fecha 29.07.2014. Este documento proporciona biomateriales obtenidos por manipulación genética derivados de productos vegetales.

Los biomateriales obtenidos por manipulación genética son útiles para aplicaciones biomédicas. Los biomateriales obtenidos por manipulación genética son capaces de favorecer el crecimiento de células animales.

5 Se puede hacer referencia a la Patente de los Estados Unidos 8,779,089 titulada "Methods and compositions for soft tissue repair" de fecha 15.07.2014. Se proporcionan composiciones y métodos para la reparación de tejidos que incluyen péptidos de enlace celular y péptidos de enlace a factores de crecimiento. Los péptidos de enlace celular se enlazan a una o más de las células madre, fibroblastos o células endoteliales. Los péptidos de enlace al factor de crecimiento incluyen péptidos de enlace al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y péptidos de enlace al factor de diferenciación del crecimiento (GDF). El tejido a reparar puede ser tendón, músculo, tejido conjuntivo, ligamento, tejido cardíaco, tejido vascular o dermis. Se proporcionan dispositivos implantables para la reparación de tejidos a los que se unen los péptidos de enlace a células y factores de crecimiento, como la matriz extracelular acelular que se ha unido al péptido de enlace.

10 15 Se puede hacer referencia a la Patente de los Estados Unidos 8,691,946 titulada "Methods and compositions for soft tissue repair" de fecha 08.04.2014. Se proporcionan composiciones y métodos para la reparación de tejidos que incluyen péptidos de enlace celular y péptidos de enlace a factores de crecimiento. Los péptidos de enlace celular se enlazan a una o más de las células madre, fibroblastos o células endoteliales. Los péptidos de enlace al factor de crecimiento incluyen péptidos de enlace al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y péptidos de enlace al factor de diferenciación del crecimiento (GDF). El tejido a reparar puede ser tendón, músculo, tejido conectivo, ligamento, tejido cardíaco, tejido vascular o dermis. Se proporcionan dispositivos implantables para la reparación de tejidos a los que están unidos los péptidos de enlace a células y factores de crecimiento, tales como una matriz extracelular acelular que tiene unión a un péptido de enlace.

20 25 Se puede hacer referencia a la Patente de Estados Unidos 9,220,757 titulada "Method for inducing in vivo migration of stem cell" de fecha 29.12.2015. Este documento se relaciona con una composición implantable para tratar un tejido dañado y un método para inducir una migración in vivo de una célula para el tratamiento a una región de tejido dañado. En este documento, el tejido dañado se trata induciendo/promoviendo la conducción de una célula para la generación de tejido mediante la implantación de un armazón biodegradable reaccionado con factores quimiotácticos (por ejemplo, IL-8 o MIP-3 alfa) en una localización dañada (por ejemplo, cartílago articular o piel). Por lo tanto, la composición de este documento no sólo se puede aplicar al tratamiento de un tejido óseo dañado, un cartílago articular, o un tejido de la piel de manera más conveniente y eficiente en comparación con la tecnología convencional, pero también puede ser utilizado como un agente suplemento de tratamiento útil en el tratamiento celular utilizando células alogénicas al permitir la utilización eficiente de los recursos celulares para el tratamiento, los recursos celulares que son muy escasos.

30 35 Se puede hacer referencia a la Patente de los Estados Unidos 9,217,129 titulada "Oscillating cell culture bioreactor" de fecha 22.12.2015. Se proporcionan métodos y dispositivos para el cultivo de células o tejidos. Un aspecto proporciona un biorreactor que tiene una cámara de circuito cerrado permeable al gas para el cultivo de células o tejidos, y un medio oscilante para mover la cámara de circuito cerrado permeable al gas bidireccionalmente a lo largo de un eje horizontal a un eje normal a la cámara de circuito cerrado para forzar la convección de las células y fluido en la cámara de circuito cerrado permeable al gas. El biorreactor incluye opcionalmente un armazón producido por manipulación tisular, un medio de entrada, un medio de salida y sensores integrados. Otro aspecto proporciona un biorreactor que tiene una pluralidad de cámaras permeables al gas, de circuito cerrado para el cultivo de células o tejidos. También se proporcionan métodos para cultivar células y producir constructos tisulares.

40 45 Se puede hacer referencia a la Patente de Estados Unidos 9,155,607 titulada "Compositions and methods for repair or regeneration of soft tissue" de fecha 30.10.2015. Se divultan bio-armazones y métodos para uso en la reparación de tejidos blandos. Este documento proporciona un armazón biocompatible sustancialmente libre de hueso mineralizado que comprende hueso esponjoso desmineralizado sustancialmente desprovisto de todos los factores osteoinductores, el hueso esponjoso desmineralizado que comprende al menos una primera región y una segunda región, en donde un gradiente de concentración de enlaces cruzados está configurado para extenderse entre la primera región a la segunda región de tal manera que la concentración de los enlaces cruzados en la primera región es sustancialmente mayor que la concentración de los enlaces cruzados en la segunda. La primera región tiene mayor resistencia mecánica que la segunda. La primera región que comprende hueso desmineralizado rígido tiene mayor resistencia a la degradación enzimática en relación con la segunda región.

50 55 Se puede hacer referencia a la Patente de los Estados Unidos 8,287,854 titulada "Skin equivalents derived from umbilical cord mesenchymal stem/progenitor cells and umbilical cord epithelial stem/progenitor cells" de fecha 16.10.2012. Este documento se relaciona con un equivalente cutáneo y a un método para producirlo, en donde el equivalente cutáneo comprende un armazón y células madre/progenitoras aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical. Estas células madre/progenitoras pueden ser células madre mesenquimales (UCMC) y/o epiteliales (UCEC), que a su vez pueden diferenciarse en fibroblastos y queratinocitos. Se describe además un método para aislar células madre/progenitoras de la membrana amniótica del cordón umbilical, en donde el método comprende separar la membrana amniótica de los demás componentes del cordón umbilical

5 *in vitro*, cultivar el tejido de la membrana amniótica bajo condiciones que permitan la proliferación celular, y aislar las células madre/progenitoras de los cultivos de tejido. Este documento también hace referencia a los usos terapéuticos de estos equivalentes cutáneos. Otro aspecto de este documento se relaciona con la generación de una célula productora de mucina utilizando células madre/progenitoras obtenidas de la membrana amniótica del cordón umbilical y los usos terapéuticos de dichas células productoras de mucina. En otro aspecto más, el documento se relaciona con un método para generar una célula productora de insulina utilizando células madre/progenitoras aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical y usos terapéuticos de las mismas. El documento se refiere además a un método para tratar un trastorno óseo o cartilaginoso utilizando UCMC. Además, el documento hace referencia a un método para generar una dopamina y una tirosina hidroxilasa, así como un HLA-G y hepatocitos utilizando UCMC y/o UCCEC. El presente documento 10 también se refiere a un método para inducir la proliferación de queratinocitos envejecidos utilizando UCMC.

15 Se puede hacer referencia a Patente de los Estados Unidos 6,497,875 titulada "Multilayer skin or dermal equivalent having a layer containing mesenchymal stem cells" de fecha 24.12.2002. En este documento, se forma un equivalente cutáneo multicapa que tiene una capa de armazón que contiene células formadoras de dermis, y una capa de queratinocitos. Las células formadoras de dermis y los queratinocitos son preferiblemente autólogos, y las células formadoras de dermis pueden ser células madre mesenquimales humanas (MSC), fibroblastos dérmicos (por ejemplo, fibroblastos dérmicos papilares o reticulares) o mezclas de estos.

20 El armazón es preferiblemente colágeno de tipo I solo, o colágeno de tipo I y II en combinación. También se forma un equivalente de piel multicapa que tiene una capa de armazón que contiene una capa de componente de matriz extracelular que contiene fibroblastos dérmicos papilares en relación laminar con una capa de componente de matriz extracelular que contiene fibroblastos dérmicos reticulares, y una capa de queratinocitos. Se proporciona un equivalente dérmico multicapa que tiene una capa de componente de matriz extracelular que contiene células formadoras de dermis papilar y una capa de componente de matriz extracelular que contiene células formadoras de dermis reticular. En otra realización, el equivalente dérmico tiene una capa que contiene MSC y una capa seleccionada entre una capa de componente de matriz extracelular que contiene células formadoras de dermis papilar y una capa de componente de matriz extracelular que contiene células formadoras de dermis reticular, y opcionalmente una capa de queratinocitos. En la piel y equivalentes dérmicos, al menos una capa puede contener un agente que promueva la adhesión o angiogénesis. También puede haber 25 un agente bioactivo que potencie la proliferación, compromiso o diferenciación de las células madre mesenquimales en componentes dérmicos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. También se proporciona una composición inyectable que contiene células formadoras de dermis y un componente de matriz extracelular en un portador inyectable farmacéuticamente aceptable.

30 Puede hacerse referencia a la Solicitud No. US2016129045 (A1) titulada "COMPOSITION FOR WOUND-HEALING COMPRISING ADULT STEM CELLS AND ELASTIN-LIKE POLYPEPTIDES". Se proporciona una composición para la cicatrización de heridas que contiene células madre adultas y polipéptidos tipo elastina, y más específicamente, una composición para la cicatrización de heridas capaz de tratar eficazmente heridas cutáneas administrando simultáneamente polipéptidos tipo elastina junto con células madre adultas, aumentando así la viabilidad de las células madre adultas trasplantadas en las heridas y promoviendo la 35 angiogénesis.

40 Puede hacerse referencia a la Solicitud No. WO2016072435 (A1) titulada "AGENT FOR MAINTAINING STEMCELLS IN UNDIFFERENTIATED STATE AND AGENT FOR PROMOTING GROWTH THEREOF". Este documento aborda el problema de encontrar una nueva sustancia capaz de mantener las células madre en un estado indiferenciado al tiempo que promueve eficazmente el crecimiento de estas, y proporcionar dicha sustancia como agente para mantener las células madre en un estado indiferenciado o como agente para promover el crecimiento de estas. Este documento también aborda el problema de proporcionar un agente cicatrizante económico y altamente seguro que tenga un efecto cicatrizante en la piel, y que pueda utilizarse fácilmente en los campos de la medicina de regeneración de la piel y cuidado de belleza. Este documento se relaciona con un agente para mantener las células madre en un estado indiferenciado, un agente para promover el crecimiento de las mismas, o un agente de curación de heridas, y contiene, como ingrediente activo, una mezcla de uno o más glicéridos de ácidos grasos representados por la fórmula general (I) (en la fórmula, al menos uno de R1, R2 y R3 es un grupo acilo derivado de un ácido graso insaturado C16-22, y el resto son un átomo de hidrógeno o un grupo acilo derivado de un ácido graso saturado).

45 Puede hacerse referencia a la Solicitud No. KR20150088228 (A) titulada "COMPOSITIONS COMPRISING AMNIOTIC MESENCHYMAL STEM CELL FOR THE TREATMENT OF SKIN WOUND". Este documento se relaciona con una composición farmacéutica que comprende células madre mesenquimales amnióticas, una cantidad farmacéuticamente eficaz de los medios acondicionados y un portador farmacéuticamente aceptable para la curación de una herida de la piel. Las células madre mesenquimales amnióticas de acuerdo con este documento, en comparación con las células madre mesenquimales hepáticas, expresan y secretan altamente genes y proteínas para la angiogénesis, aumentan significativamente la transferencia de células y promueven la curación de la herida. Además, las células madre mesenquimales amnióticas trasplantadas se injertan 50 60

altamente en la herida cutánea y expresan altamente proteínas específicas de los queratinocitos, pudiendo así utilizarse ventajosamente en la curación de una herida cutánea.

Puede hacerse referencia a la solicitud No. CN104312970 (A) titulada "Preparation method of clinical treatment level epidermal stem cell for cell therapy by applying human extracellular matrix screening and mass culture".

Este documento divulga la tecnología de cultivo, cribado y amplificación para el nivel de tratamiento clínico de las células madre epidérmicas, y los cuellos de botella siempre han sido el punto caliente y la dificultad de la investigación en el campo de la biología de las células madre; y actualmente, se utiliza la propiedad de adhesión significativa de la membrana basal para la separación y purificación, y se emplea el método de amplificación de cultivo tridimensional para obtener las células. Lo que se describe en este documento es adecuado para células de tipo adherente de amplificación dependiente y proporciona alta simulación tridimensional del sistema de matriz extracelular *in vivo* para el cribado y separación a nivel de células diana. Una novedosa técnica de cultivo de células biológicas que comprende una alta simulación del entorno adherente *in vivo* y el cultivo *in vitro* de células madre cutáneas adultas (embrionarias). La alta simulación de entorno adherente de la matriz extracelular para el cribado y cultivo de células madre epidérmicas objeto tiene las ventajas de alta capacidad de paso, alta capacidad de proliferación y formación de estructuras corticales de diferenciación en entorno *in vitro*. Las células inmunogénicas cribadas adquieren de forma segura el escape inmunitario, tienen un tiempo de trasplante prolongado y aumentan la aplicación clínica de tejidos obtenidos por manipulación. Por lo tanto, el método proporciona una solución absolutamente ventajosa para el tratamiento clínico a nivel de células para promover la cicatrización de heridas y enfermedades de la piel.

Puede hacerse referencia a la solicitud No. CN104263699 (A) titulada "Culture method for large-scale preparation of clinical treatment level dermal multipotent stem cells for cell transplantation". Este documento divulga una tecnología de cultivo, cribado y amplificación de células madre multipotentes dérmicas a nivel de tratamiento clínico. Estos cuellos de botella son siempre problemas candentes y difíciles de la investigación en el campo de las células madre biológicas; en la actualidad, la separación y purificación se llevan a cabo utilizando la notable característica de adhesión de una membrana basal, y las células madre multipotentes dérmicas de nivel de tratamiento clínico se obtienen adoptando un cultivo tridimensional y medios de amplificación. La tecnología es aplicable al cribado y separación de un nivel de células diana dependiendo de la amplificación de células de tipo adherente y proporcionando un sistema de matriz extracelular *in vivo* tridimensional de alta simulación. Se trata de una novedosa tecnología de cultivo de células biológicas, y las células madre adultas (de piel de embrión) se someten a cultivo *in vitro* en un entorno adjunto *in vivo* de alta simulación. El entorno donde se encuentra un sustrato de alta simulación adhiere, criba y cultiva células madre multipotentes dérmicas diana, de modo que la capacidad de paso es alta, la capacidad de multiplicación es alta y se puede formar una estructura dérmica diferenciada de espesor total en un entorno *in vitro*. Se eliminan por cribado las células inmunógenas, de modo que se obtiene un escape inmunológico seguro, se prolonga el tiempo de trasplante, se mejora la aplicación clínica de la manipulación genética de tejidos, se promueve la curación de una superficie de herida y se proporciona un esquema de solución celular a nivel de tratamiento clínico con ventajas absolutas para las enfermedades de la piel.

Puede hacerse referencia a la Solicitud No. US2014341865 (A1) titulada "Dressing Material with Cell Components for Wound Healing". Se proporciona un apósito para tratar una herida. El apósito para la cicatrización de una herida puede ser útil para mantener un entorno húmedo en el lugar de la herida utilizando un armazón de polímero biocompatible, y promover eficazmente la cicatrización de una herida mediante diversos factores de crecimiento secretados por células de la piel o células madre adheridas también al armazón de polímero biocompatible.

Puede hacerse referencia a la Solicitud No. US2013243882 (A1) titulada "PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING SKIN WOUND". El presente documento proporciona un método para tratar una herida cutánea en un sujeto, que comprende administrar a la herida cutánea una composición que comprende células madre mesenquimales umbilicales. Más concretamente, la composición se utiliza para mejorar la cicatrización de heridas.

Puede hacerse referencia a la solicitud No. CN102172337 (A) titulada "Tissue engineering skin with sebaceous gland-like structure and preparation method thereof". Este documento proporciona piel obtenida por manipulación de tejidos con una estructura similar a la de las glándulas sebáceas. En la piel obtenida por manipulación de tejidos, una capa de dermis se forma mediante la distribución de células madre mesenquimales placentarias (PMSC) en una solución de gel, en donde la solución de gel consiste en una matriz extracelular libre de antígenos (ECM) y proteínas con para una función de formación de una estructura de glándula sebácea a través de la inducción de modo que la solución de gel tiene una función de generación de la estructura de glándula sebácea a través de la inducción; una capa epidérmica consiste en células epiteliales amnióticas (AEC) inducidas por queratinización y AEC no inducidas; y la estructura tipo glándula sebácea entre la capa epidérmica y la capa de la dermis se construye mediante una masa de AEC inducida a lo largo de la dirección de la glándula sebácea. La piel obtenida por manipulación de tejidos está dotada de una estructura tipo glándulas sebáceas y tiene perspectivas de aplicación para resistir a las bacterias, humedecer la piel y reducir el riesgo de infección post trasplante. Los experimentos con animales demuestran que la piel obtenida por manipulación de tejidos proporcionada por este documento tiene las ventajas de mejorar obviamente la

rata de curación y rata de éxito de una superficie de la herida de trasplante, realización de una amplia fuente de células, fuerte capacidad de multiplicación y más tiempos de paso, siendo beneficioso para la producción a gran escala de células semilla, y la reducción del coste industrial.

5 Puede hacerse referencia a la solicitud No. CN101361990 (A) titulada "Double layer artificial skin and preparation method thereof". El presente documento divulga una piel artificial de doble capa y un método de preparación de la misma, en donde se utiliza un material derivado biológico membranoso libre de células como capa superficial, y un fibroblasto, una matriz extracelular sintetizada y secretada por el fibroblasto y un factor de crecimiento celular se combinan en el interior del material de soporte biológico para formar una dermis, y a continuación la capa superficial y la dermis se combinan para formar la piel artificial de doble capa; una estructura compacta de la capa superficial puede reducir eficazmente la pérdida de agua, electrolitos y proteínas de la superficie de la herida, evitar la invasión y la reproducción de bacterias en la superficie deteriorada de la herida, así como la infección de la superficie de la herida, y ser beneficiosa para la epiteliosis y el crecimiento epitelial; la dermis puede reparar directamente la superficie de la herida, promover la recuperación de células alrededor de la superficie de la herida y la angiogénesis, inducir la diferenciación de células madre a células de la piel y acelerar la cicatrización de la herida; la piel artificial tiene las ventajas de ser capaz de promover la regeneración de la piel, mejorar la elasticidad, la flexibilidad y la resistencia a la abrasión mecánica de la piel una vez cicatrizada la superficie de la herida, reducir el exceso de tejido cicatricial, controlar la contractura, tener una excelente biocompatibilidad, aumentar la rata de éxito del trasplante y mejorar la calidad de la cicatrización; la piel artificial de doble capa tiene amplios recursos materiales y un método de producción sencillo, y es aplicable al tratamiento clínico de defectos cutáneos causados por inflamación, úlcera, quemaduras térmicas, iatrogenia y similares.

20 25 Puede hacerse referencia a la Solicitud No. CN101361989 (A) titulada "Double membrane tissue patching material and preparation method thereof". Este documento divulga un material de reparación de tejido membranoso de doble capa y un método de preparación del mismo, en donde se usa un material derivado biológico membranoso libre de células como capa superficial, y se combina un fibroblasto en el interior de un material de soporte biológico para formar un sustrato, y luego la capa superficial y el sustrato se combinan de forma química para formar el material de reparación de tejido membranoso de doble capa; una estructura compacta de la capa superficial puede reducir eficazmente la pérdida de agua, electrolitos y proteínas de la superficie de la herida, evitar la invasión y la reproducción de bacterias en la superficie deteriorada de la herida, así como prevenir la infección de la superficie de la herida, siendo así beneficioso para la epiteliosis y el crecimiento epitelial; el sustrato puede reparar directamente la superficie de la herida, promover la recuperación de células alrededor de la superficie de la herida y la angiogénesis, inducir la diferenciación de células madre a células cutáneas y acelerar la cicatrización de la herida; en comparación con los productos existentes, el material de reparación de tejidos tiene las ventajas de ser capaz de promover la regeneración de la piel, mejorar la elasticidad, la flexibilidad y la resistencia a la abrasión mecánica de la piel una vez cicatrizada la superficie de la herida, reducir la hiperplasia de los tejidos cicatrales, controlar la contractura, tener una biocompatibilidad excelente, aumentar la rata de éxito del trasplante y mejorar la calidad de la cicatrización; el tema descrito en este documento tiene amplios recursos materiales y un método de producción sencillo; el material de reparación tisular membranoso de doble capa preparado es aplicable al tratamiento clínico de defectos cutáneos causados por inflamación, úlcera, quemaduras térmicas, iatrogenia y similares.

30 35 40 Sin embargo, ninguna de las técnicas anteriores comprende una técnica novedosa y única de cultivo de células madre mesenquimales humanas en una capa proliferativa y subconfluente sobre una membrana biocompatible para formar láminas adecuadas para injertos como las comprendidas en la presente invención, la presente invención proporciona un sustituto de piel artificial mejor, eficiente, fácil de usar, rentable, listo para usar, biodegradable y biocompatible de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

Objetos de la invención:

El objetivo principal de la invención es proporcionar un constructo de tejidos artificial obtenido por biomanipulación genética para la rápida cicatrización de heridas y regeneración tisular.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un constructo de tejidos biodegradable y biocompatible listo para usar con un producto a base de células madre humanas autólogas/alogénicas.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un método de preparación de dicho dispositivo.

Otro objetivo de la invención es desarrollar un constructo de tejido artificial obtenido por biomanipulación genética para la cicatrización de heridas por quemaduras y heridas crónicas.

Resumen de la invención:

55 Cualquier referencia en esta descripción a métodos de tratamiento de una enfermedad, debe interpretarse como una referencia a compuestos, agentes o composiciones (como se divultan aquí) para uso en dichos métodos.

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas y tiene como base una técnica novedosa y única de cultivo de células madre mesenquimales humanas en una capa proliferante y subconfluente sobre una membrana biocompatible para formar láminas adecuadas para injertos. La invención proporciona un producto a base de un constructo de tejido biodegradable y biocompatible listo para usar con células madre humanas autólogas/alogénicas definido en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención también permite que un procedimiento reconstructivo cumpla los requisitos específicos necesarios para lograr un cierre satisfactorio de la herida y también para restaurar la integridad funcional en el menor tiempo y con las menores complicaciones y morbilidad. La matriz extracelular proporcionada por la presente invención tiene propiedades tipo tejido y puede utilizarse para cicatrización de heridas y regeneración de tejidos.

10 Breve descripción de los dibujos:

Figura 1: La figura 1 muestra las células madre mesenquimales humanas cultivadas sobre la matriz desarrollada en el día 4.

Figura 2: La figura 2 muestra las células madre mesenquimales humanas cultivadas sobre la matriz desarrollada en el día 10.

15 Figura 3: La figura 3 muestra las células madre mesenquimales humanas cultivadas en la matriz desarrollada en el día 15 (a) Vista de campo claro (b) Tinción con Calceína-AM (c) Tinción con DAPI (d) Fusión.

Figura 4: La figura 4 muestra las células madre mesenquimales humanas cultivadas sobre la matriz desarrollada en el día 17.

Figura 5: La figura 5 muestra las imágenes de microscopio electrónico de barrido de la matriz desarrollada.

20 Figura 6: La figura 6 muestra las imágenes de microscopio electrónico de barrido de células madre mesenquimales humanas cultivadas sobre matriz desarrollada en el día 15.

Enunciado de la invención:

Por consiguiente, la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones anexas, tiene como base un complejo polielectrolítico (PEC) de armazón tridimensional mejorado con alta porosidad, dicho armazón que comprende una pluralidad de polímeros compuestos sin utilizar ningún entrecruzante ni agentes de lixiviación/espumantes/tensioactivos ni ningún producto químico nocivo integrado, en donde dicho armazón es no adherente y tiene porosidad diferencial y un método para preparar dicho armazón.

Descripción detallada de la invención:

30 Debe tenerse en cuenta que la descripción particular y las realizaciones expuestas en la especificación a continuación son simplemente a modo de ejemplo de la amplia variedad y disposición de instrucciones que pueden emplearse con la presente invención. La presente invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las características divulgadas en esta especificación pueden ser sustituidas por otras características similares o alternativas que realicen propósitos similares o iguales o equivalentes y que entren dentro del ámbito de las reivindicaciones modificadas.

40 La presente invención se define en las reivindicaciones anexas y tiene como base una técnica novedosa y única de cultivo de células epidérmicas humanas en una capa proliferante y subconfluente sobre una membrana biocompatible para formar láminas adecuadas para injertos. La invención proporciona un producto a base de un constructo tisular biodegradable y biocompatible listo para usar con células madre humanas autólogas/alogénicas definido en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención también permite que un procedimiento reconstructivo cumpla los requisitos específicos necesarios para lograr un cierre satisfactorio de la herida y también para restaurar la integridad funcional en el menor tiempo y con las menores complicaciones y morbilidad. La matriz extracelular proporcionada por la presente invención tiene propiedades tipo tejido y puede utilizarse para la cicatrización de heridas. Los aspectos útiles para comprender la invención se dirigen a constructos de tejidos obtenidos por biomanipulación genética de células cultivadas y componentes de matriz extracelular producidos endógenamente sin el requisito de componentes de matriz exógenos o miembros de soporte de red o armazón. De este modo, resulta ventajoso que se fabriquen íntegramente a partir de células humanas y de componentes de matriz humana producidos por dichas células, por ejemplo, cuando el constructo de tejidos obtenido por biomanipulación genética se diseñe para uso en humanos. Este aspecto útil para comprender la invención también se dirige a métodos para producir constructos tisulares mediante la estimulación de células en cultivo, tales como células madre mesenquimales, fibroblastos y queratinocitos y células madre mesenquimales diferenciadas en fibroblastos y queratinocitos para producir componentes de matriz extracelular sin la adición de componentes de matriz exógenos, soporte de red o miembros de armazón.

45 Además, este constructo tisular puede realizarse mediante siembras de células madre mesenquimales y células de fibroblastos y queratinocitos y células madre mesenquimales diferenciadas de fibroblastos y queratinocitos para producir un constructo tisular cultivado que imite la composición celular y las estructuras tisulares de los tejidos nativos. Los constructos tisulares de la invención son útiles para fines clínicos, como el injerto a un paciente con un defecto tisular u orgánico, como una úlcera cutánea o una herida, o para pruebas tisulares *in vitro* o injertos en animales, como para pruebas de seguridad o validación de productos farmacéuticos, cosméticos y químicos.

50

55

60

La presente invención utiliza células madre mesenquimales (MSC) proliferativas/preconfluentes, fibroblastos, queratinocitos y células madre mesenquimales diferenciadas de fibroblastos y queratinocitos mediante las cuales las células se transfieren del cultivo al lecho de la herida. Esta metodología es ventajosa sobre la técnica anterior en que:

- 5 1. Ayuda a cicatrizar las heridas.
- 2. Garantiza la rápida cicatrización de las heridas.
- 3. Garantiza un entorno húmedo en la herida evitando su desecación.
- 4. Los injertos pueden realizarse en 15 días.
- 10 5. Es económico y ofrece un tratamiento alternativo a las terapias estándar de manejo de heridas.
- 6. El riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas se reduce drásticamente gracias a los rigurosos controles del proceso.

Las células se cultivan directamente sobre el sistema de administración (armazón). Por lo tanto, las células con armazón pueden transferirse como tales al paciente, evitando así los posibles daños que se producen en la separación enzimática convencional del recipiente de cultivo. Las células se transfieren en estado proliferativo.

- 15 En algunas realizaciones, el uso de células preconfluentes ayuda a la adherencia de dichas células a la herida, ya que expresan un perfil de integrinas diferente del de las células terminales totalmente diferenciadas. El componente interactivo de la invención se proporciona mediante el uso de células madre mesenquimales en proliferación activa. Durante la reparación tisular se liberan en el lugar de la herida una serie de citoquinas, factores de crecimiento, etc.
- 20 Las células en el lugar de la herida expresan moléculas que tienen un efecto tanto autocrino como paracrino. Sin embargo, la expresión de estos factores depende de la etapa de cicatrización de la herida. Las células de la piel administradas en el lugar de la herida, dependiendo de las señales presentes en el lugar de la herida, sobre regulan/subregulan determinados factores y ayudan así a la reparación de la herida. Así, las células mejoran la cicatrización al interactuar con los factores presentes en el lugar de la herida.

- 25 Los usos de un sustituto de piel artificial son útiles tanto para la reparación como para la regeneración. La reparación indica el proceso que experimenta un tejido para regenerarse/reformarse completamente. Células madre mesenquimales alogénicas utilizadas en esta cobertura de heridas para reparar la piel dañada dando lugar a su regeneración.

- 30 El proceso implica la optimización de los armazones sobre los que se siembran las células para formar un tejido uniforme con armazones que proporcionan señales físicas y químicas para guiar el proceso. Los armazones se componen de biopolímeros naturales quitosano y gelatina. Los armazones adoptan formas que van desde láminas esponjosas a geles, pasando por estructuras muy complejas con intrincados poros y canales fabricados con nuevas tecnologías de procesamiento de materiales. Las propiedades espaciales y de composición del armazón, su porosidad y la interconectividad de los poros son necesarias para permitir la penetración de las células en la estructura, así como el transporte de nutrientes y productos de desecho.

- 35 En el marco de la presente invención, se lleva a cabo el tratamiento fisicoquímico secuencial temporizado de los dos o más polímeros para obtener un armazón 3D de complejo polielectrolítico (PEC) secado al aire y también al mismo tiempo utilizando una proporción de aspecto específicamente diseñada de un sistema de agitación/homogeneización. El tratamiento físico-químico secuencial temporizado de los polímeros puede ser como disolución de gelatina al 3 % a una temperatura de 35-75 ° C, preferentemente a 60 ° C, en donde el proceso comprende:

- 40 a. Agitar la solución de gelatina a 2500-3200 rpm a temperatura 15-30 ° C durante 20-30 minutos.
- b. Agregar ácido, preferentemente ácido acético glacial (0.5-2.5 %) a rata de 1 ml/minuto y a una temperatura de 15-30 ° C durante 5-15 minutos.
- 45 c. Agregar quitosano a una concentración final del 1.0 %, preferiblemente DAC al 80 %, a la rata de 1mg/ml a temperatura 15-30 ° C durante 80-130 minutos.

- 50 Una vez completado el método anterior de tratamiento físico-químico de los polímeros, se lleva a cabo el proceso de secado al aire de la solución compuesta. El secado al aire de la solución compuesta preparada se lleva a cabo a una RH de 5-44 %, temperatura de 5-18 ° C, preferiblemente a 12 ° C y RH al 20 %.

- 55 Además, se siembran células madre mesenquimales en un armazón biocompatible a una densidad celular de 0.1×10^6 a 0.5×10^6 células/cm². Las células son monocapa y confluentes entre el 80 % y 100 % en la etapa final de formulación del producto. Las células madre mesenquimales utilizadas para la siembra son de pasaje 2 a pasaje 5. Las células madre mesenquimales utilizadas para la siembra son células madre mesenquimales humanas y sólo población pura. Las células madre mesenquimales secretan varios factores de crecimiento y citoquinas (matriz extracelular) útiles para cicatrización de heridas y regeneración de tejidos.

Además, el producto final obtenido se transportará en medio semisólido. El medio semisólido es un medio de agar del 1 % al 3 % y un medio de cultivo celular con factores de crecimiento esenciales. El medio de agar contiene HEPES 2-3 gm/l y bicarbonato de sodio 2-3.5 gm/l. El medio semisólido contiene medio de agar y

medio de cultivo celular en una proporción de 5:5, 6:4, 7:3 y 8:2 o cualquiera de ellos, respectivamente. El medio semisólido mantiene la viabilidad celular de la matriz entre el 60 % y el 90 % a la temperatura de 4 ° C a 37 ° C durante 28 días.

- 5 La invención se dirige a constructos tisulares obtenidos por biomanipulación genética de células cultivadas y componentes de matriz extracelular producidos endógenamente sin el requisito de componentes de matriz exógenos o soporte de red o miembros de armazón. Así pues, la invención puede realizarse ventajosamente en su totalidad a partir de células humanas y componentes de matriz humana producidos por dichas células, por ejemplo, cuando el constructo de tejido obtenido por biomanipulación genética está diseñada para uso en humanos.
- 10 Un aspecto útil para comprender la invención también se dirige a métodos para producir constructos de tejido mediante la estimulación de células en cultivo, tales como células madre mesenquimales, fibroblastos y queratinocitos y células madre mesenquimales diferenciadas en fibroblastos y queratinocitos para producir componentes de matriz extracelular sin la adición de componentes de matriz exógenos, soporte de red o miembros de armazón.
- 15 Además, este constructo tisular puede hacerse sembrando células madre mesenquimales o células de fibroblastos y queratinocitos o células madre mesenquimales diferenciadas de fibroblastos y queratinocitos para producir un constructo tisular cultivado que imite la composición celular y estructuras tisulares de tejidos nativos.
- 20 Los constructos tisulares de la invención son útiles para fines clínicos, como el injerto a un paciente con un defecto tisular u orgánico, como una úlcera cutánea o herida, o para pruebas tisulares *in vitro* o injertos en animales, como para pruebas de seguridad o validación de productos farmacéuticos, cosméticos y químicos.

Ejemplos:

Los siguientes ejemplos tienen únicamente fines ilustrativos y, por tanto, no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas:

Ejemplo 1:

- 25 Preparación de las muestras secadas al aire: Primero se toman 100 ml de agua ultrapura en un vaso de precipitados. A continuación, se añaden 3 g de gelatina al vaso de precipitados que contiene agua y se disuelven calentándola. Una vez disuelta y calentada la solución, se homogeneiza utilizando un agitador. A continuación, se añaden 1 ml de ácido acético y se homogeneiza durante 1 minuto; después, se añaden 1.5 gm de quitosano a la solución y se homogeneiza durante 90 minutos. Una vez homogeneizada la mezcla, se vierte en bandejas y se deja secar al aire. Una vez seca la muestra, se corta en el tamaño deseado.

Neutralización de las muestras secadas al aire:

Las muestras trituradas se sumergen en una solución de amoníaco, se lavan y se secan con pequeños toques y/o bajo vacío.

Inoculación de células madre mesenquimales y su cultivo:

- 35 Se sembraron 1×10^5 células en el armazón preacclimatado (armazón empapado en medio de cultivo celular) y se cultivaron las células al día 15-18. Después/entre los días 15-18, los armazones estaban completamente llenos de MSC y ricos en factores de crecimiento y nutrientes.

Ejemplo 2:

Viabilidad celular

- 40 La viabilidad celular de las células sembradas se evaluó mediante el ensayo colorimétrico MTT. La viabilidad celular se evaluó a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas. Las células se sembraron en el armazón (1×10^5 células/pozo, n=6) y se incubaron en una placa de 96 pozos. El reactivo MTT (20 µl/pozo) se añadió a cada pozo de acuerdo con el protocolo del fabricante y se incubó durante 3 horas a 37 ° C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂. La viabilidad celular se evaluó midiendo la densidad óptica (OD) en un lector ELISA de microplacas, a 570 nm y 630 nm de referencia. El porcentaje de células viables se calculó como:

Porcentaje (%) viabilidad = (Absorbancia de células tratadas / Absorbancia de células control) x 100

Ejemplo 3:

Microscopía de fluorescencia

- 50 Las células madre mesenquimales (MSCs) sembradas en el armazón fueron evaluadas mediante microscopio de fluorescencia. Tras 15 días de siembra celular en armazones, las células se tiñeron con Calcein-AM y DAPI

durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS y se observaron al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse Ti U, Japón).

Ejemplo 4:

Evaluación con microscopio electrónico de barrido

- 5 Las células madre mesenquimales (MSC) sembradas en el armazón también se evaluaron mediante microscopio electrónico de barrido. Las células con los armazones se fijaron con regulador de glutaraldehído al 3 % a 4 ° C durante 2 horas y se analizó el armazón en el microscopio electrónico de barrido.

Ejemplo 5:

- 10 Se evaluó la viabilidad celular de las células madre mesenquimales sembradas en el armazón a diferentes temperaturas con y sin CO₂ para el transporte del producto desarrollado. Hemos evaluado la viabilidad celular a 4 ° C, 25 ° C y 37 ° C.

Hemos preparado un medio semisólido de agar añadiendo algunas sales y medio de cultivo y colocamos el armazón con células en este medio semisólido y evaluamos la viabilidad celular en diferentes intervalos de tiempo (día 1, 3, 7, 11, 14, 18, 21, 25 y 28) utilizando el ensayo MTT. El reactivo MTT (20 µl/pozo) se añadió a 15 cada pozo de acuerdo con el protocolo del fabricante y se incubó durante 3 horas a 37 ° C en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂. La viabilidad celular se evaluó midiendo la densidad óptica (OD) en un lector ELISA de microplacas, a 570 nm y 630 nm de referencia. El porcentaje de células viables se calculó como:

$$\text{Porcentaje (\%)} \text{ viabilidad} = (\text{Absorbancia de células tratadas} / \text{Absorbancia de células control}) \times 100$$

Ejemplo 6:

- 20 Pruebas de eficacia *in vivo* del producto

Las células sembradas en los armazones se cultivaron durante 15 días y después estos armazones con células se aplicaron sobre la superficie de la herida por quemadura creada en la rata Sprague Dawley (herida de 2 cm × 2 cm creada utilizando metal calentado). Los animales fueron sacrificados a intervalos de tiempo regulares (1, 4, 8, 11, 15, 18 y 22) y se realizaron estudios histológicos, bioquímicos de los tejidos y de las citoquinas sanguíneas.

30 El sustituto de piel artificial preparado es un sustituto potencial de la piel natural y ayuda a la cicatrización de heridas (heridas por quemaduras, úlcera de pie diabético y todo tipo de heridas cutáneas). Se realizaron diversos experimentos para comprobar dicha eficacia del sustituto de piel artificial. La viabilidad celular, microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido confirman el crecimiento y distribución celular a los 15 días. Los estudios *in vivo* confirmaron la potencial propiedad cicatrizante del sustituto de piel artificial preparado.

Los resultados obtenidos del potencial y propiedades del producto de esta invención se encontraron considerablemente eficaces. Indica claramente el avance técnico en comparación con el estado de la técnica.

35 Así pues, la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones anexas, tiene como base un complejo polielectrolítico (PEC) de armazón tridimensional mejorado con alta porosidad, dicho armazón que comprende una pluralidad de polímeros compuestos sin utilizar ningún entrecruzante ni agentes de lixiviación/espumantes /tensioactivos ni ningún producto químico nocivo integrado, en donde dicho armazón es no adherente y tiene porosidad diferencial y un método para preparar dicho armazón.

40 En un aspecto útil para la comprensión de la invención, dichos polímeros se seleccionan preferentemente, pero no se limita a, gelatina, quitosano, colágeno, alginato, alcohol polivinílico, carboximetilcelulosa, hidrolizado de gelatina, hidrolizado de quitosano, colágeno parcialmente desnaturalizado y ácido hialurónico.

De acuerdo con la invención, dichos polímeros son gelatina en un intervalo de 1 %-4 % y quitosano en un intervalo de 0.5 %-2.5 %.

45 Dicha gelatina puede tener una fuerza de 50-300 resistencia a emerger y el DAC de quitosano puede oscilar entre 75 %-95 %.

En otra realización, dicho método de preparación del armazón comprende el tratamiento físico-químico; la descomposición de las burbujas de aire secas estabilizadas y la estabilización del armazón.

50 En aún otra realización, dicho método comprende un tratamiento físico-químico secuencial y temporizado de los dos o más polímeros para obtener un armazón 3D de complejo polielectrolítico (PEC) secado al aire y también al mismo tiempo utilizando una proporción de aspecto específicamente diseñada de un sistema de agitación/homogenización.

En otra realización, se proporciona un método de preparación de un complejo polielectrolítico de armazón tridimensional (PEC), dicho método comprende la introducción de la degradación de burbujas de aire secas estabilizadas y la preparación de dicho PEC utilizando una proporción de aspecto específicamente diseñado de un sistema para agitar la solución polimérica.

- 5 En otra realización, dicho método comprende la estabilización del armazón y lavado seguido del secado por exprimido para dejarlo listo para uso como siembra de células, carga de factores de crecimiento, etc.

En aún otra realización, la proporción de aspecto preferida es diámetro del impulsor:altura (2.34:1), diámetro del recipiente:diámetro del impulsor (1.3:1), diámetro del impulsor:diámetro del eje (4.4:1) y eje de salida:eje de entrada (2.6:1).

- 10 En otra realización, el armazón 3D obtenido se somete a romper las burbujas de aire aplicando una presión que oscila entre 5kg-50kg/cm², más preferiblemente 0.13 bar/cm² seguido de un tratamiento con solución de amoníaco (7.5-25 %) durante 15-45 minutos y lavado con agua ultrapura (18.5 mohm) 4-5 veces y exprimido para hacer el armazón estable y funcional para la siembra de células.

- 15 En otra realización, el armazón obtenido se liofiliza para hacer el armazón estable para la siembra de células madre mesenquimales humanas (MSC) autólogas o alogénicas, fibroblastos humanos, queratinocitos humanos, fibroblastos diferenciados de células madre mesenquimales y queratinocitos.

Las células madre mesenquimales se siembran en un armazón biocompatible a una densidad celular de 0.1×10^6 a 0.5×10^6 células/cm².

Las células son monocapa y confluentes del 80 % al 100 % en la etapa final de formulación del producto.

- 20 En otra realización, las células sembradas en el armazón se cultivan en un medio libre de suero y libre de elementos foráneos.

En otra realización, las células madre mesenquimales son autólogas, alogénicas o ambas.

En otra realización, las células madre mesenquimales secretan varios factores de crecimiento y citoquinas (matriz extracelular) útiles para la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos.

- 25 En otra realización, el producto final se transporta en un medio semisólido.

En otra realización, el medio semisólido proporciona nutrientes y soporte a la matriz.

En otra realización, el medio semisólido es medio agar (1 % a 3 %) con medio de cultivo celular que contiene factores de crecimiento esenciales.

En otra realización, el medio de agar contiene HEPES 2-3 gm/l y bicarbonato de sodio 2-4 gm/l.

- 30 En otra realización, el medio semisólido contiene medio de agar y medio de cultivo celular en una proporción de 5:5, 6:4, 7:3 y 8:2 o cualquiera de ellos respectivamente.

En otra realización, el medio semisólido mantiene la viabilidad celular de la matriz entre el 60 % y 90 % a una temperatura de 4 ° C a 37 ° C durante 28 días.

Ventajas de la invención:

- 35 -El armazón de la presente invención no se pega a la herida.
-La presente invención comprende una mejora de la higiene de las heridas.
-Puede fabricarse en cualquier tamaño y forma según las necesidades.
-Fácil de manejar.
-Pueden aplicarse múltiples productos para heridas más grandes.
40 -Se puede quitar fácilmente.
-Ecológico, ya que se degrada fácilmente.
-Ayuda a cicatrizar las heridas.
-Garantiza la rápida cicatrización de las heridas.
-Garantiza un entorno húmedo en la herida evitando su desecación.
45 -Los injertos pueden realizarse en 15 días.
-Es económico y ofrece un tratamiento alternativo a las terapias estándar de tratamiento de heridas.
-El riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas se reduce drásticamente gracias a los rigurosos controles del proceso.

REIVINDICACIONES

1. Un constructo de tejido obtenido por biomanipulación genética que comprende:

una monocapa confluyente del 80 % al 100 % de células cultivadas seleccionadas entre células madre mesenquimales, fibroblastos y queratinocitos, y células madre mesenquimales diferenciadas en fibroblastos y

5 queratinocitos; y

un complejo polielectrolítico de armazón tridimensional con alta porosidad, dicho armazón comprende una pluralidad de polímeros compuestos preparados sin utilizar ningún entrecruzante o agente lixiviante/espumante/tensioactivo ni ninguna sustancia química nociva integrada,

en donde dichos polímeros son gelatina en un intervalo de 1 %-4 % y quitosano en un intervalo de 0.5 %-2.5

10 %, y

en donde dicho armazón es no adherente y tiene porosidad diferencial.

2. Un constructo de tejido obtenido por biomanipulación genética de acuerdo con la reivindicación 1, en donde las células se siembran en el armazón y se cultivan en un medio libre de suero y libre de elementos foráneos, preferentemente en donde dichas células son células madre mesenquimales humanas que se siembran a una

15 densidad celular de 0.1×10^6 a 0.5×10^6 células/cm².

3. Un constructo de tejido obtenido por biomanipulación genética de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde las células son células madre mesenquimales humanas y son autólogas o alogénicas o ambas, preferentemente en donde las células madre mesenquimales humanas secretan factores de crecimiento y citoquinas útiles para cicatrización de heridas y regeneración tisular.

4. Un constructo de tejido obtenido por biomanipulación genética de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el complejo polielectrolítico de armazón tridimensional se prepara introduciendo la descomposición de burbujas de aire secas estabilizadas y la preparación de dicho complejo utilizando una proporción de aspecto específicamente diseñada de un sistema para agitar una solución polimérica, en donde las proporciones de aspecto preferidas son como diámetro del impulsor:altura (2.34:1), diámetro del recipiente: diámetro del impulsor (1.3:1), diámetro del impulsor:diámetro del eje (4.4:1) y eje de salida:eje de entrada (2.6:1).

5. Un constructo de tejido obtenido por biomanipulación genética de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además un medio de transporte semisólido.

6. Un constructo de tejido obtenido por biomanipulación genética de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el medio semisólido contiene 1-3 % de medio agar con medio de cultivo celular que contiene factores de crecimiento esenciales, preferentemente dicho medio agar contiene 2-3 gm/l de HEPES y 2-4 gm/l de bicarbonato de sodio, preferentemente el medio semisólido contiene medio agar y medio de cultivo celular en la proporción 5:5, 6:4, 7:3 u 8:2.

7. Un constructo de tejido obtenido por biomanipulación genética de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la viabilidad de dichas células está comprendida entre el 60 % y el 90 % a una temperatura de 4 ° C a 37 ° C durante 28 días.

8. Un método para preparar un tejido de biomanipulación genética que comprende las siguientes etapas:

a. Disolver la gelatina al 3 %, a una temperatura de 35-75 ° C, preferentemente a 60 ° C;

b. Agitar la solución de gelatina a 2500-3200 rpm durante 20-30 minutos a una temperatura de 15-30 ° C;

40 c. Añadir un ácido, preferentemente ácido acético glacial (0.5-2.5 %), a una tasa de 1 mL/minuto y a una temperatura de 15-30 ° C durante 5-15 minutos;

d. Añadir quitosano a una concentración final de 1 %, preferentemente en donde el quitosano tiene una DAC del 80 %, a una tasa de 1 mg/mL a 15-30 ° C durante 80-130 minutos para formar una solución de polímero compuesto;

45 e. Secar al aire la solución compuesta preparada a una humedad relativa del 5-44 % y a una temperatura de 5-18 ° C, preferentemente a una humedad relativa del 20 % y a una temperatura de 12 ° C, para formar un complejo polielectrolítico de armazón tridimensional, en donde opcionalmente el armazón se liofiliza;

f. Sembrar células madre mesenquimales en el armazón a una densidad celular de 0.1×10^6 a 0.5×10^6 células/cm²,

50 en donde, opcionalmente, el armazón obtenido se somete a rotura de las burbujas de aire formadas aplicando una presión que oscila entre 5 kg-50 kg/cm², preferentemente 0.13 bar/cm², seguida de tratamiento con una solución de amoníaco al 7.5-25 % y lavado con agua ultrapura (18.5 mohm) durante 4-5 veces y exprimido.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la proporción de aspecto del sistema para agitación/homogeneización son como diámetro del impulsor:altura (2.34:1), diámetro del recipiente:diámetro del impulsor (1.3:1), diámetro del impulsor:diámetro del eje (4.4:1) y eje de salida:eje de entrada (2.6:1).

10. Un tejido obtenido por biomanipulación genética de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el tejido de biomanipulación genética obtenible por el método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 para uso en regeneración tisular y cicatrización de heridas.

5 11. Un tejido obtenido por biomanipulación genética de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o el tejido de biomanipulación genética obtenible por el método de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9 para uso en injertos a un paciente con defecto de tejido u órgano, como úlcera cutánea o herida.

Fig. 1

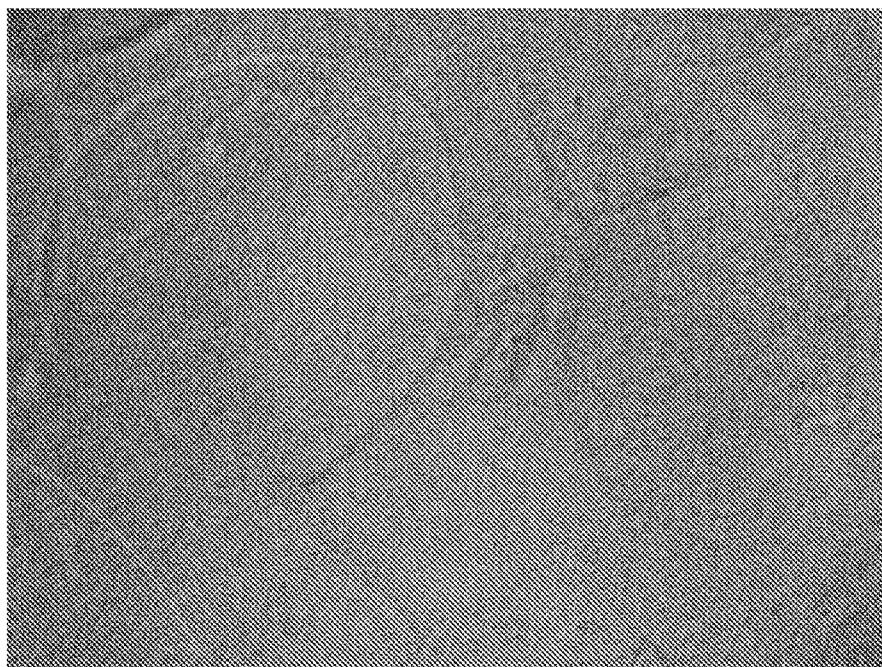
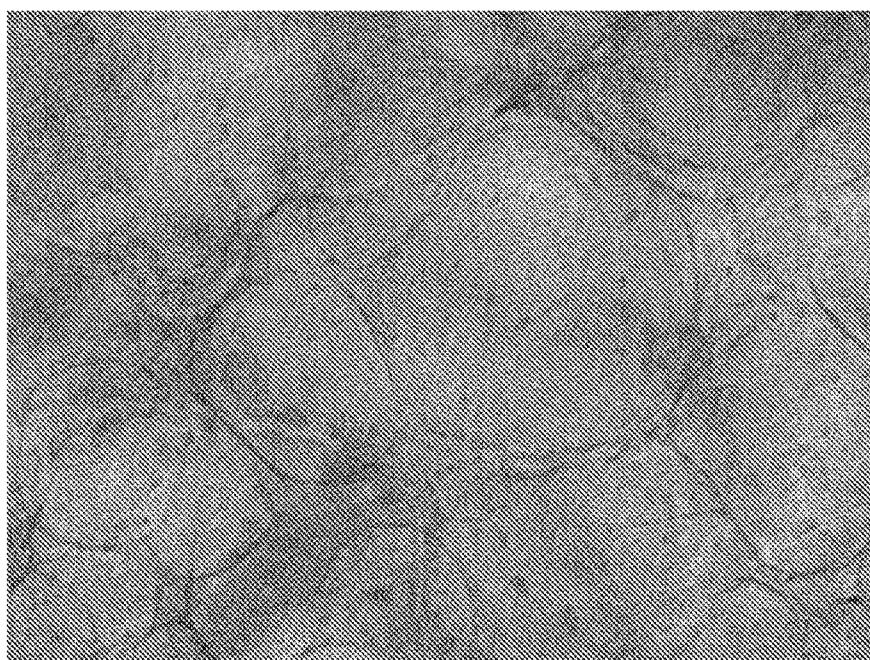


Fig. 2



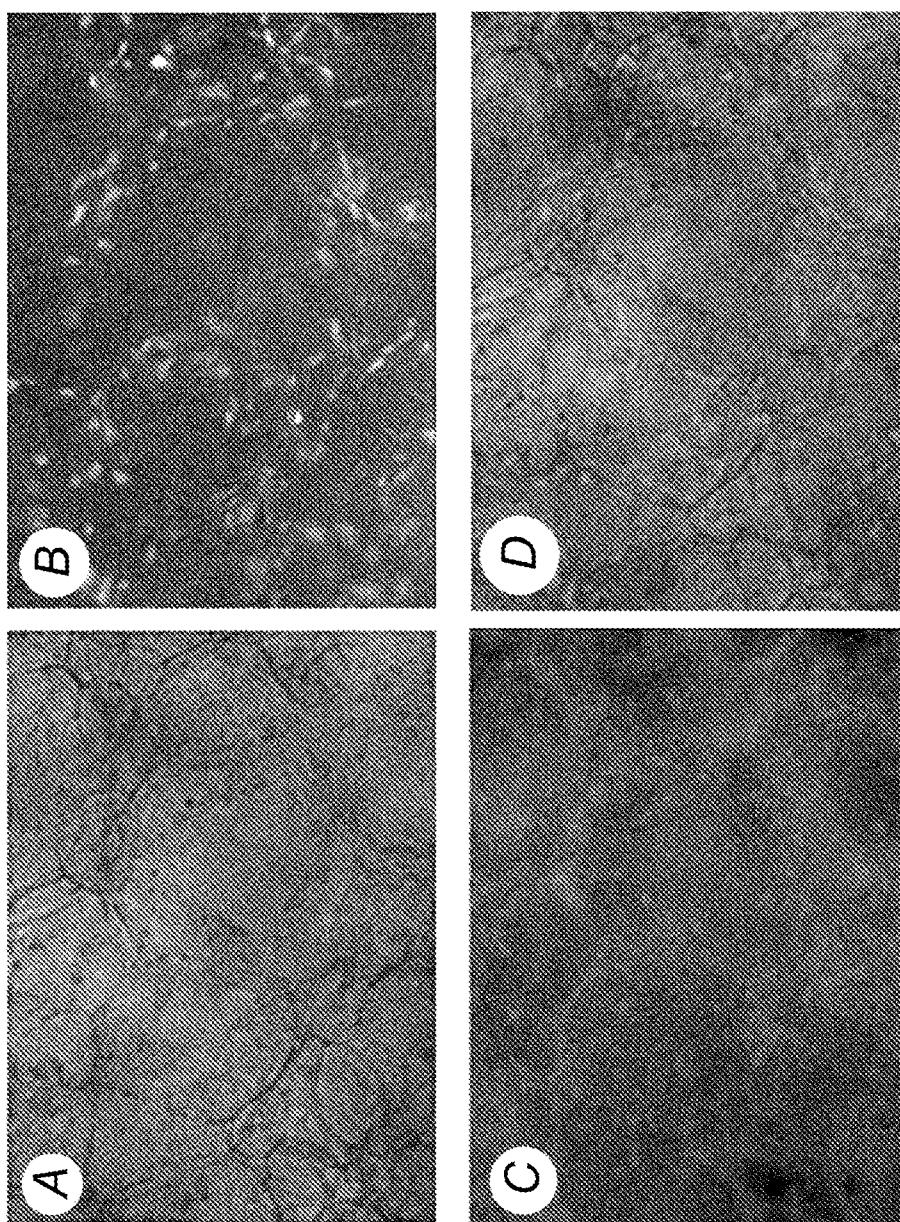


Fig. 3

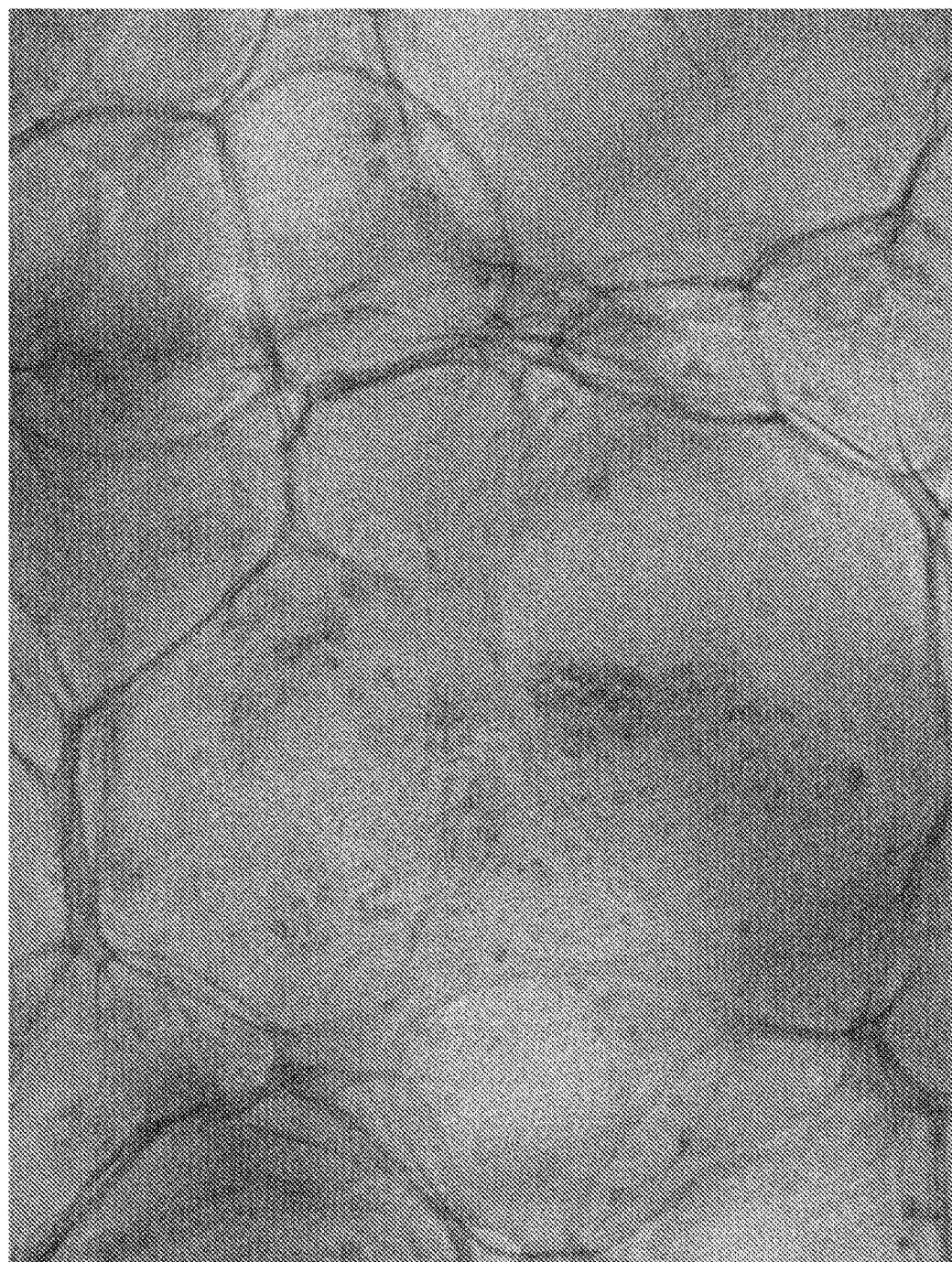


Fig. 4

ES 2 989 554 T3

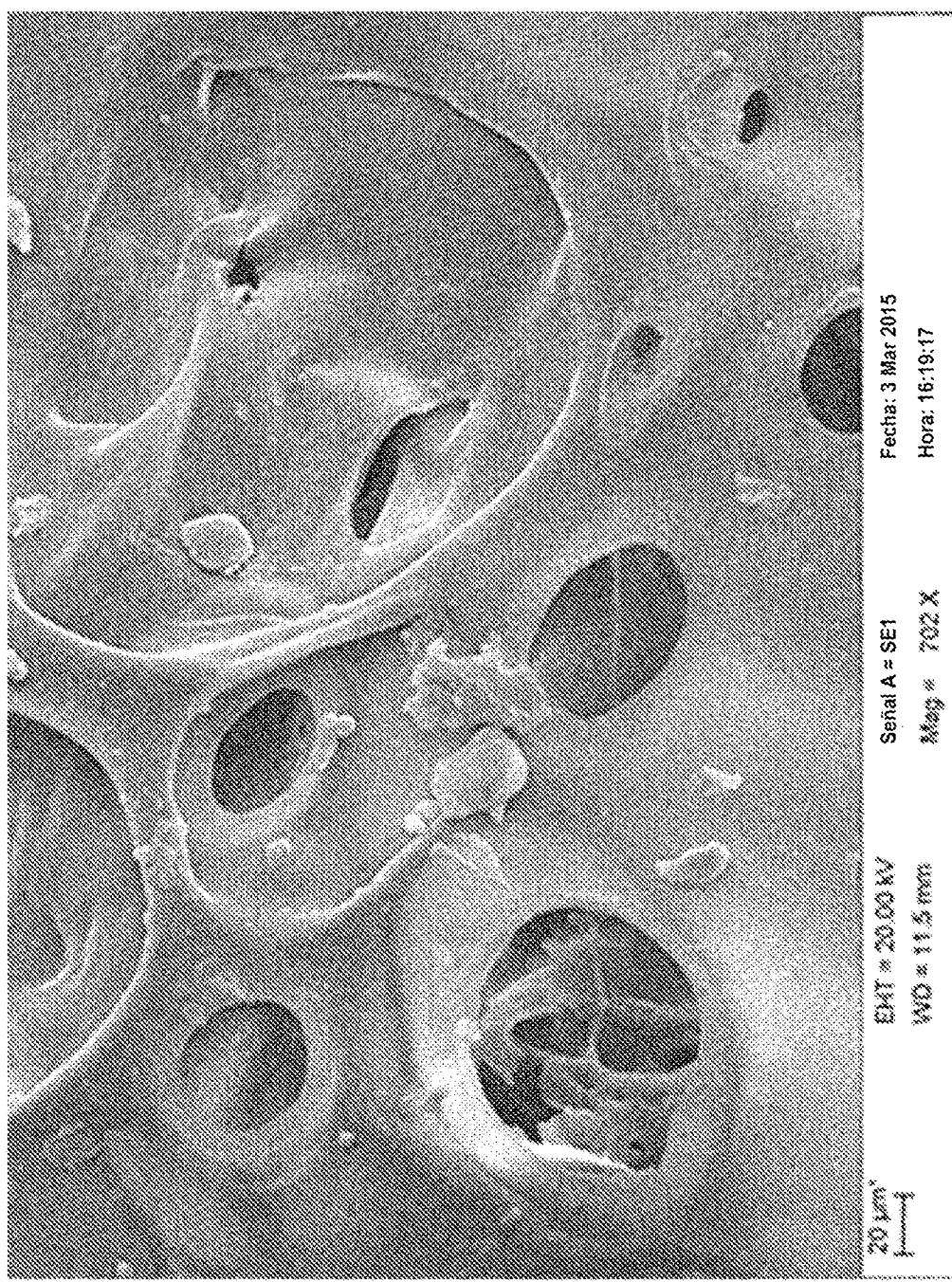


Fig. 5

ES 2 989 554 T3

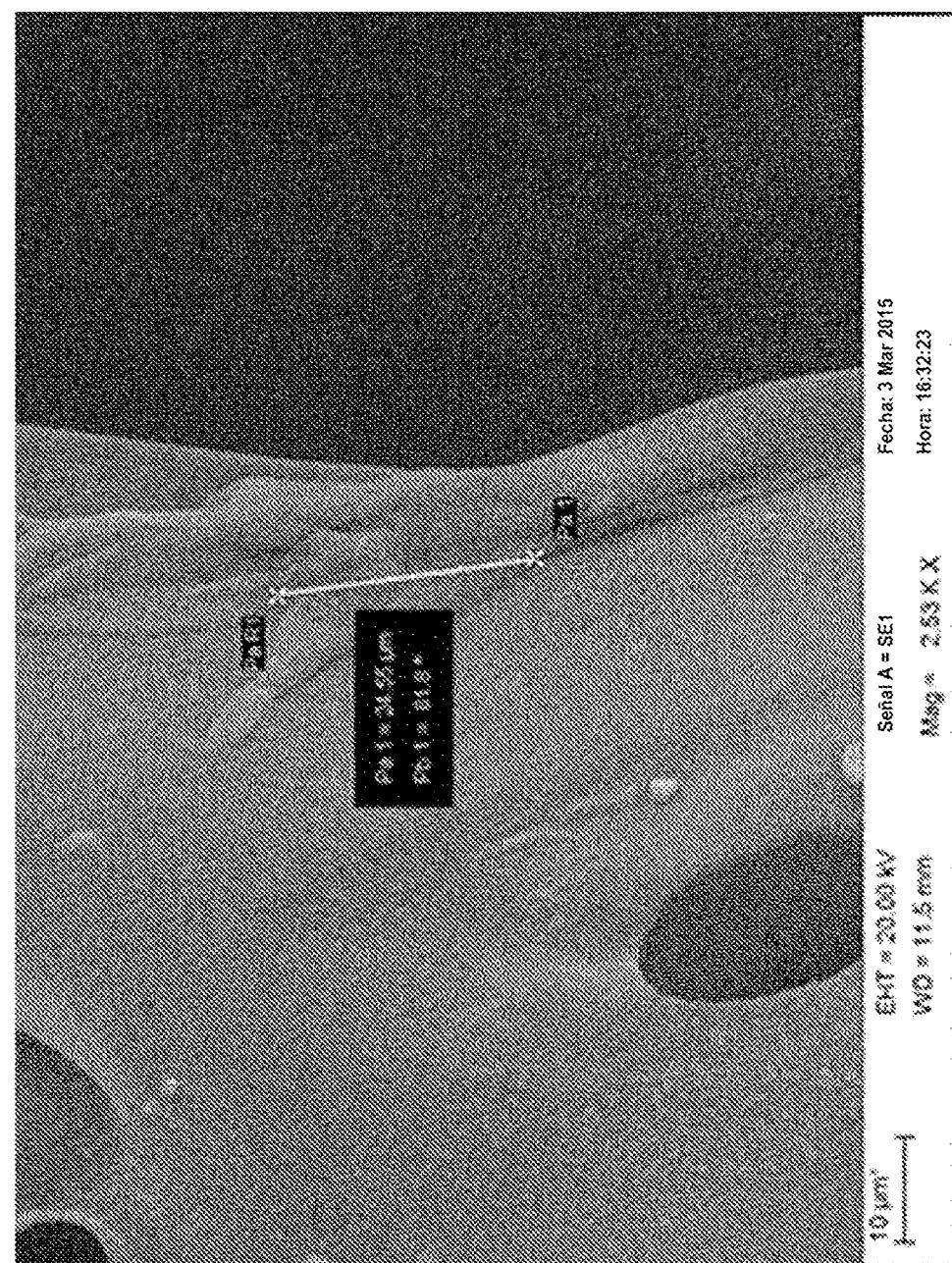


Fig. 6