



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 060**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/07** (2006.01)  
**C12N 5/071** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04737624 .9**  
96 Fecha de presentación : **28.07.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1664280**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Sistema para regeneración de la piel.**

30 Prioridad: **28.07.2003 AU 2003903896**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**31.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**31.05.2011**

73 Titular/es: **Queensland University of Technology  
Gardens Point Campus, 2 George Street  
Brisbane, Queensland 4000, AU**

72 Inventor/es: **Upton, Zee;  
Harkin, Damien y  
Leavesley, David**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 360 060 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

Sistema para regeneración de la piel

## 5 Campo de la invención

Esta invención se refiere al cultivo de células. Más particularmente, esta invención se refiere a un medio, sistema y procedimiento para propagar células epiteliales de mamífero, preferiblemente queratinocitos para uso posterior en el crecimiento y la regeneración de la piel. También se dan a conocer composiciones para uso en el crecimiento y la regeneración de la piel.

Antecedentes de la invención

Los factores de crecimiento tipo insulina (IGF), IGF-I e IGF-II, son factores de crecimiento peptídicos mitogénicos implicados en una amplia gama de procesos celulares entre los que se incluyen la hiperplasia, síntesis de ADN, diferenciación, progresión del ciclo celular e inhibición de la apoptosis (Keiss y col., 1994, Hormone Research 41 66; Wood & Yee, 2000, J. Mammary Gland Biology and Neoplasia 5 1; Jones y Clemmons, 1995, Endocrine Rev. 16 3). Estos efectos están mediados por enlace a su receptor de la superficie celular vinculado a la tirosina quinasa, el receptor de tipo IGF 1 (IGF-IR). Los IGF están también estrechamente regulados por una familia de proteínas de unión específicas, denominadas IGFBP, cuyo papel primario es unir los IGF libres y de este modo moderar sus semivida, especificidad y actividad (Clemmons, 1998, Mol. Cell. Endocrinol. 140 19).

Recientemente, se ha demostrado que la vitronectina (VN) se une directamente a IGF-II (Upton y col., 1999, Endocrinology 140 2928-31) mientras que IGF-I se puede unir a la VN en presencia de determinadas IGFBP (Publicación Internacional WO 02/24219; Krickler y col., 2003, Endocrinol. 144 2807-15). El hallazgo de que VN, una molécula de adhesión y organización de la matriz extracelular (ECM), se une a IGF-II con una afinidad que es similar a la que presenta IGF-II por IGF-IR (Upton y col., 1999, más arriba), su receptor biológicamente relevante, revela un vínculo físico específico entre la acción del IGF y la VN en la ECM. Adicionalmente, el IGF-II unido a la VN, y el IGF-I unido a la VN mediante las IGFBP, puede estimular respuestas funcionales sinérgicas in vitro en una amplia gama de células entre las que se incluyen queratinocitos humanos (Publicación Internacional WO 02/24219; Noble y col., 2003, más arriba), Krickler y col., 2003, más arriba).

Las heridas, quemaduras y úlceras son dolencias de la piel debilitantes y dolorosas que requieren tratamientos intensivos y costosos que, en muchos casos, solo tienen éxito en parte. Por ejemplo, más de 520.000 australianos actualmente se han diagnosticado de diabetes, y de estos, más del 5% experimentarán úlceras en los pies. Estas heridas afectan significativamente la calidad de vida del paciente, llevando a menudo a una hospitalización prolongada, y al final pueden conducir a una amputación. De hecho, la amplia mayoría de las amputaciones de las extremidades inferiores realizadas se deben a una úlcera que no cicatriza.

Un enfoque cada vez más seguido para cicatrizar heridas, quemaduras y úlceras es sustituir la piel muerta o dañada por queratinocitos autólogos o alogénicos que han crecido in vitro. Típicamente, los queratinocitos se hacen crecer en medios definidos en presencia de factores exógenos como suero o extractos de pituitaria bobina, habitualmente con células alimentadoras que optimizan el crecimiento de los queratinocitos.

## 45 Resumen de la invención

Los sistemas de cultivo celular típicos de la técnica anterior son relativamente caros en virtud de la inclusión de los factores exógenos anteriormente mencionados. Además, los factores exógenos derivados de animales tales como suero o extractos de pituitaria bobina están relativamente mal definidos y pueden albergar agentes infecciosos tales como los que causan la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, por sus siglas en inglés), VIH y otras enfermedades.

Con este fin, los presentes inventores han descubierto que los complejos de proteína que comprenden IGF-II y VN o IGF-I e IGFBP y VN estimulan respuestas proliferativas significativas en cultivos celulares primarios ex vivo en ausencia de suero. Más particularmente se pueden utilizar complejos de proteínas que comprenden IGF-II y VN o IGF-I e IGFBP y VN para estimular el crecimiento de queratinocitos a objeto de sustitución de piel, cicatrización de quemaduras y heridas y otros tratamientos terapéuticos que necesiten el crecimiento de piel ex vivo.

Por tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona un medio de cultivo para células epiteliales de mamífero que comprende:

(i) al menos un IGF seleccionado entre IGF-I e IGF-II en donde, cuando IGF-I está presente de manera diferente a una quimera sintética IGF1/VN, el medio de cultivo comprende una proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP) seleccionado entre IGFBP3 o IGFBP5;

5

(ii) vitronectina (VN) o al menos un fragmento de unión al receptor de la integrina del mismo;

(iii) una o más proteínas activas biológicas distintas que estimulan el crecimiento y/o la diferenciación celular; y

10 (iv) en ausencia de suero o de una cantidad de suero que en ausencia de IGF-I o IGF-II no soportaría el crecimiento de células epiteliales.

En una realización, el suero está presente hasta una concentración no superior al 1% (v/v).

15 En otra realización el suero está presente hasta una concentración no superior al 0,5% (v/v).

En otra realización adicional el suero está presente hasta una concentración no superior al 0,1% (v/v).

En otra realización adicional más, el suero está ausente.

20

Preferiblemente, el fragmento de VN no comprende un dominio de unión a heparina (HBD).

Preferiblemente, el fragmento de VN comprende una región polianiónica.

25 De forma adecuada, el receptor de la integrina es un receptor de la integrina  $\alpha v$ .

En otras realizaciones, cuando el medio de cultivo de células epiteliales de mamífero comprende una o más proteínas activas biológicas distintas dichas proteínas son EGFEGF y/o bFGF.

30 En realizaciones particulares, las células epiteliales son queratinocitos o progenitores de queratinocitos o células de la córnea.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un sistema de cultivo de células epiteliales humanas que comprende un recipiente de cultivo y el medio de cultivo de células epiteliales de mamífero del primer aspecto.

35

En un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para cultivo de células epiteliales de mamífero que incluye la etapa de cultivar una o más células epiteliales de mamífero en el sistema de cultivo de células epiteliales de mamífero del segundo aspecto.

40 En un cuarto aspecto, la invención proporciona el uso del medio de cultivo de células epiteliales de mamífero del primer aspecto.

En toda esta memoria descriptiva, a menos que se indique de otro modo, "comprende", "comprenden" y "que comprenden" se utiliza de forma inclusiva en lugar de exclusiva, de forma que un número entero o grupo de números

45

enteros definidos pueden incluir uno o más de otros números enteros o grupos de número enteros no definidos.

Breve descripción de las figuras

50 Figura1. Crecimiento de queratinocitos en presencia de complejos de proteína aislados y células alimentadoras en ausencia de suero. El crecimiento promedio de queratinocitos recientemente aislados con VitroGro (células +3t3) respecto al método convencional en el que está presente tanto suero bovino como células +3t3. P0, P1 y P2 respecto al número de veces que las células se han recogido y vuelto a plaquear (P0 = rendimiento de las células inmediatamente tras aislado de una muestra de piel). Los datos se obtuvieron mediante tinción con MTT que se convirtió en un sustrato coloreado mediante las células en crecimiento. No se muestran las barras de error debido a

55

Figura 2. Morfología de queratinocitos tras crecimiento en presencia de complejos de proteína aislados y células alimentadoras en ausencia de suero. Las células se hicieron crecer durante 3 semanas en presencia de suero fetal bovino y células +3t3 de ratón (A) o que crecieron durante 3 semanas en presencia de VitroGro (B; vitronectina,

IGFBP5 y IGF-I) y células +3t3 de ratón 3t3 en ausencia de suero. La barra de escala mide aproximadamente 200 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ).

Figura 3. Actividad relativa de los complejos de proteína aislados que contienen IGFBP3 o IGFBP5. Control = medio de crecimiento de queratinocitos normalizado suplementado con suero fetal bovino al 10%. VitroGro-3 = vitronectina, IGFBP3 y IGF-I (exento de suero). VitroGro5 = vitronectina, IGFBP5 e IGF-I (exento de suero). Todos los cultivos se hicieron crecer en presencia de células +3t3 de ratón sometidas a radiación gamma.

Figura 4. Complejos de proteínas IGF que soportan la expansión *ex vivo* de los queratinocitos. Los queratinocitos derivados de piel humana adulta sembrados sobre complejos de proteínas IGF sobreviven y crecen a tasas comparables a las de las células sembradas sobre células +3t3 de ratón irradiadas en presencia de suero bovino fetal. El crecimiento celular se observó mediante: (a) examen visual de la morfología/confluencia del cultivo; y (b) se cuantificó mediante el ensayo con MTT. (a) de izquierda a derecha: capa alimentadora + suero bovino; control sin capa alimentadora o suero; IGF-I + IGFBP5 + VN sin capa alimentadora o suero; (b) de izquierda a derecha: Medio de Green + capa alimentadora + suero bovino; Medio de Green + capa alimentadora solamente; Medio de Green insulina + IGF-I, + IGFBP-3 + VN; Medio de Green insulina + IGF-I, + IGFBP-5 + VN. VN está presente a 300 ng/pocillo. IGF-I o IGF-II están presentes a 100 ng/pocillo y las IGFBP están presentes a 300 ng/pocillo.

Figura 5. Los complejos de proteínas IGF suplementados con otros factores de crecimiento potencian adicionalmente el crecimiento de los cultivos de queratinocitos. Los queratinocitos derivados de piel humana adulta se cultivaron sobre complejos de proteínas IGF más el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y se probaron para la síntesis de proteínas mediante incorporación de leucina marcada con  $^3\text{H}$ . Las células sembradas sobre complejos de proteínas IGF-I, IGFBP5 y VN o diméricos IGF-II y VN crecen a tasas comparables a las del medio definido para queratinocitos (DKM, Invitrogen). Los complejos de proteínas IGF que incorporan adicionalmente EGF (100 ng/pocillo) y bFGF (100 ng/pocillo) potenciaron significativamente la síntesis de proteínas en comparación con DKM ( $p < 0,05$ ). IGF-I o IGF-II están presentes a 100 ng/pocillo, VN a 300 ng/pocillo y las IGFBP están presentes a 300 ng/pocillo.

Figura 6. Efecto de TISSOMAT sobre la viabilidad de los queratinocitos. Distribución celular y administración por pulverización de los factores de crecimiento de queratinocitos en placas de cultivo de 150 mm de diámetro revestidas con colágeno. Las células se pulverizaron a dos concentraciones diferentes para determinar los números de células necesarios para recubrir el área pulverizada. Los cultivos usados en la pulverización se hicieron crecer originalmente en control (con suero) o vitronectina con IGFBP3 e IGF-I (VitroGro). Todos los cultivos se prepararon en presencia de células 3t3. A continuación los cultivos se tiñeron con violeta de cristal tras 7 días de crecimiento en placas revestidas con colágeno en presencia de suero (para imitar las condiciones tras el implante en el lecho de la herida). El volumen de pulverización fue de 0,2 ml, presión de 20 psi (138 kPa), altura = 10 cm.

Figura 7. Efecto de TISSOMAT sobre la viabilidad de los queratinocitos. Los cultivos se establecieron usando el medio de cultivo convencional con suero añadido. (A) Se llevó a cabo la prueba de exclusión con azul Tripán a los minutos de pulverizar las células en el interior de un tubo de recogida. Las células viables son no permeables al colorante. (B) Los datos de conversión MTT son una medida de la viabilidad que proporciona una indicación de la actividad metabólica 24 horas tras pulverizar las células.

Descripción detallada de la invención

La presente invención ha surgido del descubrimiento que los medios de cultivo que comprenden IGF-II y VN o IGF-I e IGFBP y VN estimulan respuestas proliferativas significativas en cultivos celulares primarios *ex vivo* en ausencia de suero, lo que se necesita habitualmente para el crecimiento de queratinocitos *ex vivo*.

Además, la necesidad absoluta de células alimentadores puede eliminarse al menos en parte, especialmente en las últimas etapas del cultivo celular una vez que los cultivos celulares se han establecido.

De este modo, esta invención proporciona una tecnología que mejora la mejor práctica clínica actual para la regeneración *ex vivo* de la piel. Adicionalmente, la presente invención también proporciona la derivación y establecimiento de queratinocitos procedentes de biopsias de tejidos. En una forma preferida, la invención proporciona un medio y sistema para el cultivo de queratinocitos que utiliza vitronectina autóloga aislada del propio suero del paciente o bien producida de forma recombinante, minimizando adicionalmente el uso de sistemas de soporte xenogéneos o alogéneos, así como eliminar el uso de productos suplementarios mal definidos. Esto proporcionará por tanto un sistema de diseño de tejidos basado en células autólogas que se puede traducir en

aplicaciones terapéuticas aprobadas.

5 Para el objetivo de esta invención, por "*aislado*" se entiende un material que se ha extraído de su estado natural o bien se ha sometido a manipulación humana. El material aislado puede estar sustancial o esencialmente exento de los componentes que habitualmente le acompañan en su estado natural, o puede estar manipulado de forma que esté en un estado artificial junto a los componentes que habitualmente le acompañan en su estado natural. El material aislado puede estar en forma natural, sintética química o recombinante.

10 Según se usa en el presente documento, por "*sintético*" se entiende que no es natural sino que se ha preparado con intervención técnica humana. En el contexto de las proteínas y ácidos nucleicos sintéticos, esto abarca moléculas producidas por técnicas recombinantes o de química sintética y recombinantes como es bien sabido en la técnica.

15 Por "*proteína*" se entiende un polímero de aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales o no naturales, los aminoácidos D o L son bien conocidos en la técnica.

Un "*péptido*" es una proteína que tiene menos de cincuenta (50) aminoácidos.

Un "*polipéptido*" es una proteína que tiene cincuenta (50) o más aminoácidos.

20 En aspectos particulares, la invención proporciona un medio y sistema para cultivar células epiteliales de mamífero que comprende (i) al menos un IGF seleccionado entre IGF-I e IGF-II en donde, cuando IGF-I está presente de manera diferente a una quimera sintética IGF1/VN, el medio de cultivo comprende una proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP) seleccionado entre IGFBP3 o IGFBP5; (ii) vitronectina (VN) o al menos un fragmento de unión al receptor de la integrina del mismo; (iii) una o más proteínas activas biológicas distintas que estimulan el crecimiento y/o la diferenciación celular; y (iv) en ausencia de suero o de una cantidad de suero que en ausencia de IGF-I o IGF-II no soportaría el crecimiento de células epiteliales, de forma que no se necesitan factores exógenos derivados de animales tales como suero o bien son necesarios en niveles sustancialmente reducidos mientras que se mantiene el crecimiento y/o la viabilidad de las células.

30 Se apreciará que la invención es aplicable a cualquier tipo de célula epitelial de mamífero que responda a IGF-I y/o IGF-II.

Otras células que responden a IGF-I y/o IGF-II incluyen células derivadas del mesodermo tal como células epiteliales, mioblastos y sus progenitores, células de la médula ósea y células dendríticas.

35 La invención es de aplicación a células epiteliales de mamífero que incluyen células epiteliales de la piel tal como queratinocitos, progenitores de queratinocitos y células epiteliales córneas. De hecho, las células epiteliales tanto de la piel como corneales pueden considerarse "*queratinocitos*" puesto que ambas producen la proteína queratina.

40 Los queratinocitos y/o sus progenitores pueden derivarse de la piel normal, biopsias de la piel como las obtenidas de heridas o úlceras o de las células de la vaina exterior de la raíz (ORS) de los folículos pilosos, aunque sin limitación respecto a lo anterior.

45 Se apreciará, por tanto, que el medio, procedimiento y sistema de la invención se puede utilizar potencialmente para diseñar tejidos de sustitución para cualquier punto donde se encuentren las células epiteliales, por ejemplo, la mucosa oral y respiratoria (revestimiento interno de la boca, nariz, tráquea y esófago) y del tejido genitourinario (*por ejemplo* vagina, vejiga). Estos tejidos también pueden resultar dañados por quemadura y otros traumatismos y por tanto pueden tratarse con injertos cultivados que han crecido de la misma forma que las biopsias de la piel.

50 Las revelaciones del presente documento también pueden aplicarse a citoblastos humanos (hES), que también tienen normalmente necesidades de suero durante su cultivo.

55 Se apreciará de este modo que "*una ausencia de suero o una cantidad de suero que en ausencia del mismo al menos un IGF no soportaría el crecimiento celular*" significa tanto que no hay suero o una cantidad o concentración sustancialmente reducida de suero respecto de la que habitualmente sería necesaria para un crecimiento y/o desarrollo celular óptimo in vitro.

Por "*suero*" se entiende una fracción derivada de la sangre que comprende una amplia gama de macromoléculas, proteínas portadoras de sustancias lipoides y elementos traza, factores de unión y diseminación celular, nutrientes de bajo peso molecular y hormonas y factores de crecimiento. Operativamente, el suero se puede definir como la

fracción proteínica acelular de la sangre que queda tras retirar los glóbulos rojos, plaquetas y componentes de la coagulación del plasma sanguíneo. El suero animal más ampliamente usado en el cultivo celular es el suero fetal bovino, BSA, aunque también se puede usar suero bovino de adulto, suero de caballo, y las fracciones proteínicas de los mismos (por ejemplo, albúmina de la Fracción V de suero).

- 5 Típicamente, las células de mamífero necesitan entre 5-10% de suero dependiendo del tipo de célula, duración del cultivo, la presencia o ausencia de células alimentadoras y/u otros componentes celulares del sistema de cultivo y otros factores que son evidentes para las personas expertas en la técnica.
- 10 De este modo, en una realización preferida, la invención contempla menos de un 5% de suero, más preferiblemente menos de un 2% de suero, incluso más preferiblemente no más de un 1% de suero o ventajosamente no más de un 0,5%, 0,4%, 0,3% o 0,2 % de suero (v/v).

- 15 En realizaciones particularmente ventajosas, la invención contempla que no hay suero o que no hay más del 0,1% o del 0,05% de suero (v/v).

En realizaciones en las que IGF-I está presente, se prefiere que IGF-I sea un componente de un complejo de proteína que comprenda adicionalmente IGFBP y vitronectina (VN).

- 20 La IGFBP se selecciona entre IGFBP3 e IGFBP5.

Preferiblemente, la IGFBP es IGFBP5.

- 25 En realizaciones en las que IGF-II está presente, se prefiere que IGF-II sea un componente de un complejo de proteína aislado que comprende adicionalmente vitronectina (VN).

Se apreciará también que la vitronectina (VN) puede estar en forma monomérica o multimérica.

- 30 En una realización particular, la invención comprende VN autóloga purificada.

Preferiblemente, los queratinocitos se cultivan en recipientes de cultivo habitualmente usados en la técnica. Se apreciará de este modo que las cantidades respectivas de los IGF, VN y las IGFBP presentes durante el cultivo dependerá de factores como el tamaño del recipiente de cultivo, cantidad de medio líquido presente en el recipiente, densidad celular y otros factores conocidos en la técnica.

- 35 Como guía, en un pocillo de 1,9 cm<sup>2</sup>, las cantidades preferidas son las siguientes:

VN: 50-5000 ng, más preferiblemente 100-500 ng o ventajosamente 250-350 ng;

IGF: 0,1 a 1.000 ng, más preferiblemente 10-200 ng o ventajosamente 50-150 ng; e

- 40 IGFBP: 1 a 1.000 ng, más preferiblemente 30-700 ng o ventajosamente 300-500 ng.

- 45 De forma adecuada, el medio de cultivo de la invención comprende otros componentes definidos. Los componentes no limitantes y en algunos casos opcionales incluyen medios basales bien conocidos tales como los medios DMEM o los medios de Ham., antibióticos tales como estreptomina o penicilina, albúmina de suero humana (HSA), fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolina), suplementos de aminoácidos tales como L-glutamina, antioxidantes tales como β-mercaptoetanol, transferrina, tampones tales como tampones de carbonato, HEPES y una fuente de dióxido de carbono como los habitualmente proporcionados por incubadores de cultivos celulares.

- 50 La invención contempla también el uso de proteínas adicionales biológicamente activas que regulan el crecimiento, diferenciación, supervivencia y/o migración celular tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF; Heldin y col., 1981, Science 4 1122-1123), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF; Nurcombe y col., 2000, J. Biol. Chem. 275 30009-30018), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; Taraboletti y col., 1997, Cell Growth. Differ. 8 471-479), osteopontina (Nam y col., 2000, Endocrinol. 141 1100), trombospondina-1 (Nam y col., 2000, *más arriba*), tenascina-C (Arai y col., 1996, J. Biol. Chem. 271 6099), PAI-1 (Nam y col., 1997, Endocrinol. 138 2972), plasminógeno (Campbell y col., 1998, Am. J. Physiol. 275 E321), fibrinógeno (Campbell y col., 1999, J. Biol. Chem. 274 30215), fibrina (Campbell y col., 1999, *más arriba*) o transferrina (Weinzimer y col., 2001, J. Clin. Endocrinol. Metab. 86 1806).

Proteínas adicionales biológicamente activas preferidas son EGF y bFGF.

Las proteínas adicionales biológicamente activas tales como EGF y bFGF pueden estar presentes de 0,1 a 1000 ng o ventajosamente en 1-100 ng por pocillo de cultivo de 1,9 cm<sup>2</sup>.

5 En una realización particular, la invención contempla el uso de cualquier factor de crecimiento con un dominio del tipo de unión a la heparina.

En otra realización particular, la invención contempla el uso del LIF y/u otros agentes que inhiben la diferenciación celular además de los complejos de proteína aislados.

10

En otra realización particular adicional, la invención contempla el uso de una o más poli-L-lisina y poli-L-arginina y material celular secretado que interactúe con la vitronectina, por ejemplo polímeros de colágenos, fibronectinas, glicosaminoglicanos/proteoglicanos, lamininas, sialoproteínas y/o mucina en el medio, sistema y/o procedimiento de cultivo de la invención.

15

También se propone que la invención pueda facilitar el cultivo de células en ausencia de células alimentadoras, al menos tras las etapas iniciales de establecimiento del cultivo celular.

20 En el contexto de los queratinocitos y/o progenitores de queratinocitos, las células alimentadoras (como las células alimentadoras 3t3 irradiadas) pueden estar presente en los 6-7 días iniciales de cultivo en ausencia de suero, tras dicho plazo las células alimentadoras pueden estar ausentes durante hasta dos pasos.

25 A la luz de lo anterior, y sin desear vincularse a una teoría concreta, se propone que el IGF-I forma un complejo de proteína aislado con la IGFBP y la VN mientras que el IGF-II forma un complejo con la VN que ejerce un efecto biológico sobre el cultivo celular.

El término "*complejo de proteína aislado*" se usa en el presente documento de forma consistente con la utilizada en la Publicación Internacional WO 02/24219.

30 Los complejos de proteína aislados pueden estar preformados e incluirse en el medio de cultivo de la invención o puede formarse en el recipiente de cultivo.

Típicamente, vitronectina y/o fibronectina están unidas, inmovilizadas, revestidas o asociadas de cualquier otra forma con el recipiente de cultivo. La adición de un IGF y opcionalmente, una IGFBP, forma un complejo con la vitronectina y/o fibronectina unidas, inmovilizadas, revestidas o asociadas de cualquier otra forma con el recipiente de cultivo.

35

40 Como se ha descrito en la Solicitud Internacional PCT/AU2004/000117, los complejos de proteína aislados de la invención pueden comprender un factor de crecimiento (por ejemplo IGF-I e IGF-II), o al menos un dominio de un factor de crecimiento capaz de vincularse a un receptor análogo de un factor de crecimiento (por ejemplo, el receptor del IGF tipo 1).

45

En este contexto, por "*dominio*" se entiende al menos una porción o región de un factor de crecimiento capaz de vincularse a un receptor análogo de un factor de crecimiento. Típicamente, aunque no exclusivamente, el receptor análogo de un factor de crecimiento está expresado por una célula y la unión o enlace de dicho receptor análogo de un factor de crecimiento por el mencionado al menos un dominio de un factor de crecimiento despierta una respuesta celular como crecimiento, diferenciación, supervivencia y/o migración celular.

50

Con atención particular al IGF-I, dicho dominio comprende adecuadamente un resto del aminoácido 24, que no es un resto de leucina.

Típicamente, dicho resto es tirosina.

55 Con atención particular al IGF-II, dicho dominio comprende adecuadamente un resto del aminoácido 27, que no es un resto de leucina.

Típicamente, dicho resto es tirosina.

Con atención particular al IGF-I, en una realización dicho dominio comprende o está constituido por los restos 1 a 70 del IGF-I.

En otra realización, dicho dominio comprende o está constituido por los restos 4 a 70 del IGF-I.

Se entenderá también que otro componente de los complejos de proteína aislados de la invención es al menos un dominio de la vitronectina de unión a la integrina y también puede incluir fibronectina.

Esto incluye y abarca cualquier dominio de VN o FN que puede vincular una  $\alpha$ v integrina.

Más preferiblemente, la integrina es una  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrina o una  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrina.

10

Como se ha descrito en la Solicitud Internacional PCT/AU2004/000117, el dominio de unión a heparina (HBD) de la VN (y análogamente de la FN) no es necesario para la actividad completa de los complejos de proteína aislados.

Con respecto a VN, es más probablemente la región polianiónica de VN (y análogamente de la FN) que se requiere para la interacción con los complejos IGF-II o IGF-I/IGFBP.

15

La región polianiónica comprende los restos de aminoácido 53-64 de la secuencia de la VN madura.

Considerando lo anterior, la presente invención contempla realizaciones de proteínas sintéticas quiméricas que no incluyen el HBD y/o la región polianiónica de VN o FN.

20

Con respecto a las proteínas de VN y las secuencias de aminoácidos de la anterior que no incluyen el HBD y/o la región polianiónica, esta puede tratarse de proteínas naturales tales como la VN de 54 kDa de yema de pollo (que carece del HBD) o se puede diseñar mediante delección, mutación o truncamiento de una proteína o secuencia de aminoácidos de la VN de forma que el HBD y/o la región polianiónica estén ausentes o al menos sean sustancialmente no funcionales.

25

Se apreciará fácilmente a partir de lo anterior que los complejos de proteína aislados pueden estar en la forma que complejos de oligoproteínas asociadas no covalentemente, complejos de oligoproteínas que se han reticulado (reversible o irreversiblemente) de forma covalente o están en forma de proteínas sintéticas quiméricas.

30

Según esto, en un aspecto particular el complejo de proteína aislado puede estar en la forma de una proteína sintética quimérica.

Según se usa en el presente documento, una "*proteína quimérica*" comprende una secuencia de aminoácidos contiguos derivados de un dominio de unión del receptor de la integrina de la VN o FN y un factor de crecimiento o al menos un dominio de unión al receptor de un factor de crecimiento.

35

Sin desear vincularse a una teoría concreta, se propone que las proteínas sintéticas quiméricas pueden ser capaces de unirse simultáneamente y de activar simultáneamente un receptor análogo de dicho factor de crecimiento y un receptor de la integrina para la VN o la FN para de este modo estimular, inducir, aumentar o promover de cualquier otra manera la migración celular.

40

Una ventaja de las proteínas sintéticas quiméricas según la invención es que se producen fácilmente por síntesis química o medios recombinantes y se espera que sean más estables *in vivo*, ya que no se basan en el mantenimiento de las interacciones proteína-proteína que se requieren en los complejos de oligoproteínas no covalentes.

45

A este respecto, aunque los complejos de proteína aislados que comprenden los dominios de unión al receptor de IGF-I comprenderían también una IGFBP, se propone que según el modo de acción anteriormente mencionado, preferiblemente no está presente una IGFBP en una quimera sintética IGF-I/VN.

50

Preferiblemente, las proteínas quiméricas comprenden adicionalmente una "*secuencia enlazante*" localizada entre y contigua a una secuencia del factor de crecimiento y a una secuencia de aminoácidos de VN o FN.

55

En una realización, dicha secuencia enlazante comprende uno o más restos de glicina y uno o más restos de serina.

Los ejemplos particulares de secuencias enlazantes se pueden seleccionar entre; Gly<sub>4</sub> Ser; Gly<sub>4</sub> Ser<sub>3</sub> y (Gly<sub>4</sub> Ser)<sub>3</sub>, aunque sin limitación respecto a lo anterior.

En otra realización, la secuencia enlazante incluye un sitio de reconocimiento para escisión de la plasmina, tal como según la secuencia:

5 Leu Ile Lys Met Lys Pro

En otra realización adicional, la secuencia enlazante incluye un sitio de reconocimiento para escisión de la colagenasa-3, tal como según la secuencia:

10 Gln Pro Gln Gly Leu Ala Lys

Los anteriormente mencionados son ejemplos de fragmentos biológicamente activos de un factor de crecimiento, proteína de unión al factor de crecimiento y/o vitronectina/fibronectina.

15 En una realización, dicho "*fragmento biológicamente activo*" tiene no menos del 10%, preferiblemente no menos del 25%, más preferiblemente no menos de un 50% e incluso más preferiblemente no menos del 75%, 80%, 85%, 90% o al menos 95% de la actividad biológica de una proteína "de longitud completa".

20 También se contempla que se pueden usar según la invención factores de crecimiento variantes, proteínas de unión al factor de crecimiento y/o vitronectina/fibronectina y/o ácidos nucleicos codificantes.

25 En una realización, una "*variante*" tiene uno o más aminoácidos que se ha sustituido por aminoácidos diferentes. Es bien entendido en la técnica que algunos aminoácidos pueden cambiarse por otros con propiedades bastante similares sin cambiar la naturaleza de la actividad de la proteína (sustituciones conservativas).

En una realización, una variante comparte al menos el 70%, preferiblemente al menos un 80%, más preferiblemente al menos un 90% y ventajosamente al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento.

30 Preferiblemente, la identificación de la secuencia se mide durante al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 75%, incluso más preferiblemente al menos un 90% y ventajosamente para la longitud completa de la proteína sintética de la invención.

35 Para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia, se puede llevar a cabo un alineamiento óptimo de las secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos mediante implementaciones computerizadas de algoritmos (programa Geneworks de Intelligenetics; GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics Software Versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EEUU) o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, el que resulta con el porcentaje de homología más elevado para la ventana de comparación) generado por cualquiera de los diferentes procedimientos. También se hace referencia a la familia BLAST de programas informáticos, según se ha descrito por ejemplo en Altschul y col., 1997, Nucl. Acids Res. 25 3389.

45 En otro ejemplo, puede entenderse que "identidad de secuencia" significa el "porcentaje de correspondencia" calculado por el programa informático DNASIS (Versión 2.5 para Windows; comercializado por Hitachi Software engineering Co., Ltd., South San Francisco, California, EEUU).

Puede encontrarse una discusión detallada del análisis de secuencia en la Unidad 19.3 de CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel y col. (John Wiley & Sons Inc NY, 1995-1999).

50 La invención contempla también derivados de un factor de crecimiento, proteína de unión al factor de crecimiento y/o vitronectina/fibronectina.

55 Según se usa en el presente documento, un "*derivado*" se ha alterado, por ejemplo mediante adición, conjugación o complejación con otros restos químicos o mediante técnicas de modificación postraduccional como es bien sabido en la técnica.

Las "*adiciones*" de aminoácidos pueden incluir fusiones con otros péptidos o polipéptidos. El otro péptido o polipéptido puede, a modo de ejemplo, ayudar a la purificación de la proteína. Por ejemplo, estos incluyen una etiqueta de polihistidina, proteína de unión a maltosas, proteína fluorescente verde (GFP), Proteína A o glutatión S-

transferasa (GST).

Otros derivados incluidos en la invención incluyen, pero no se limitan a, modificación de cadenas secundarias, incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante síntesis de proteínas y el uso de reticulantes y otros procedimientos que imponen restricciones conformacionales sobre las proteínas. Los ejemplos no limitantes de modificación de cadenas secundarias incluidos en la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tales como acilación con ácido acético; acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; amidinación con metilacetimidato; carbamoilación de grupos amino con cianato; piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido por reducción con NaBH<sub>4</sub>; alquilación reductiva por reacción con un aldehído seguido por reducción con NaBH<sub>4</sub>; y trinitrobenzilación de grupos amino con ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico (TNBS).

Los grupos sulfhidrido se pueden modificar mediante procedimientos tales como oxidación mediante ácido perbórico al ácido cisteico; formación de derivados de mercurio usando ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, 4-cloromercuribenzoato 2-cloromercuri-4-nitrofenol, cloruro de fenilmercurio, y otros mercuriales; formación de disulfuros mixtos con otros compuestos de tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; y carbamoilación con cianato a pH alcalino.

El anillo imidazol de un resto histidina se puede modificar mediante N-carbetoxilación con dietilpirocarbonato o por alquilación con derivados del ácido yodoacético.

Los ejemplos de incorporar aminoácidos no naturales y derivados durante la síntesis del péptido incluyen pero no se limitan al uso de ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilpentanoico, tbutilglicina, norleucina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, 2-tienil alanina y/o isómeros D de aminoácidos.

Otros ejemplos de derivatización química de proteínas se encuentran en el Capítulo 15 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan y col., John Wiley & Sons NY (1995-2001).

Según la invención, una proteína se puede preparar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido del experto en la técnica.

En una realización, las proteínas pueden estar en forma natural sustancialmente pura.

Un ejemplo particular es la vitronectina autóloga purificada. En otra realización, una proteína se puede producir mediante síntesis química. Las técnicas de síntesis química son bien conocidas en la materia, aunque el experto puede consultar el Capítulo 18 de CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan y col., John Wiley & Sons NY (1995-2001) para ver ejemplos de metodologías adecuadas.

En otra realización adicional, una proteína se puede preparar como proteína recombinante.

La producción de proteínas recombinantes es bien conocida en la materia, el experto puede consultar protocolos estandarizados como por ejemplo los descritos en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING. A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989), en particular las Secciones 16 y 17; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY Eds. Ausubel. y col., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), en particular los Capítulos 10 y 16; y CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE Eds. Coligan y col., (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1999), en particular los Capítulos 1, 5 y 6.

Las proteínas recombinantes pueden comprender adicionalmente un compañero de fusión.

Los ejemplos bien conocidos de compañeros de fusión incluyen, pero no se limitan a glutatión-S-transferasa (GST), porción Fc de la IgG humana, proteína de unión a maltosa (MBP) y hexahistidina (HIS<sub>6</sub>), que son particularmente útiles para aislar la proteína de fusión por cromatografía de afinidad. A efectos de la purificación de la proteína de fusión mediante cromatografía de afinidad, las matrices relevantes para la cromatografía de afinidad son resinas conjugadas con glutatión, amilosa, níquel o cobalto, respectivamente. Muchas de estas matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con compañeros de fusión (HIS<sub>6</sub>) y el sistema de purificación Pharmacia GST.

En algunos casos, los compañeros de fusión también tienen sitios de escisión de proteasas, tales como para Factor

X<sub>a</sub> o Trombina, que permiten a la proteasa relevante digerir la proteína de fusión de la invención y de este modo liberar de la misma la proteína recombinante. La proteína liberada puede aislarse a continuación del compañero de fusión mediante una separación cromatográfica posterior.

- 5 Los compañeros de fusión según la invención también incluyen en su ámbito "*etiquetas de epítipo*", que son habitualmente secuencias de péptidos cortos para la que está disponible un anticuerpo concreto. Ejemplos bien conocidos de etiquetas de epítipo para las que se encuentran fácilmente anticuerpos monoclonales incluyen las etiquetas c-myc, hemoaglutinina y FLAG.
- 10 Las células hospedadoras adecuadas para la expresión pueden ser procariotas o eucariotas, como *Escherichia coli* (DH5α por ejemplo), células de levadura, células Sf9 utilizadas con un sistema de expresión en baculovirus, células CHO, COS, CV-1, NIH 3T3 y HEK293; aunque sin limitación respecto a lo anterior.

- En los procedimientos de la presente invención se pueden utilizar células, tales como queratinocitos o células progenitoras de queratinocitos, capaces de expresar al menos una proteína recombinante seleccionada entre el grupo constituido por:
- 15 (i) un IGF recombinante;  
 (ii) una IGFBP recombinante;  
 (iii) una vitronectina recombinante;
- 20 (iv) una proteína quimérica recombinante como se ha descrito anteriormente en el presente documento; y  
 (v) una proteína biológicamente activa adicional tal como EGF o bFGF.

- Según una realización particular, la expresión paracrina/autocrina de los IGF, la VN y/o las IGFBP puede permitir a los queratinocitos o progenitores de queratinocitos cultivarse en medios sin suero y sin la necesidad de agregar uno
- 25 o más factores de crecimiento, IGFBP, y/o vitronectina al medio de cultivo.

La expresión de las proteínas recombinantes se puede conseguir por introducción de una construcción de expresión en una célula de queratinocito o progenitora de queratinocitos.

- 30 Típicamente, la construcción de expresión comprende un ácido nucleico a expresar (que codifica la proteína recombinante) unido operativamente o conectado operativamente a un promotor.

El promotor puede ser constitutivo o inducible.

- 35 Los promotores constitutivos o inducibles incluyen, por ejemplo, los promotores represibles mediante tetraciclina, inducibles mediante ecdisona, inducibles mediante alcohol e inducibles mediante metalotionina. Los promotores pueden ser tanto promotores naturales (*por ejemplo* el promotor de la alfa cristalina, el promotor de ADH, fosfoglicerato cinasa (PGK), promotor del factor de elongación humano α, y promotores víricos tales como SV40, CMV, promotores derivados del VLTH), o promotores híbridos sintéticos que combinan elementos de más de un
- 40 promotor (por ejemplo el promotor SRalfa).

En una realización preferida, el vector de expresión comprende un gen marcador que se puede seleccionar. Los marcadores seleccionados son útiles tanto a objeto de selección de bacterias transformadas (tales como *bla*, *kanR* y *tetR*) o células de mamífero transformadas (tal como higromicina, G418 y puromicina).

- 45 Las construcciones de expresión se pueden introducir en las células de mamífero como los queratinocitos o células progenitoras de queratinocitos mediante procedimientos bien conocidos tales como electroporación, bombardeo con micropartículas, transferencia génica mediada por virus, precipitación con fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, liposomas catiónicos, lipofectina, lipofectamina y similares, aunque sin limitación respecto a lo anterior.

- 50 Para ejemplos particulares no limitantes de metodologías potencialmente aplicables a la expresión de proteínas factores de crecimiento recombinantes en queratinocitos, se debe consultar Supp y col., 2000, J. Invest. Dermatol. 114 5 y Supp y col., 2000, Wound Repair Regen. 8 26-35.

- 55 Composiciones farmacéuticas

Se pueden preparar composiciones farmacéuticas que comprenden una o más células producidas usando el medio y/o sistema de cultivo de la invención, tal como los queratinocitos aunque sin limitarse a los mismos, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Dichas composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para estimular o facilitar de cualquier otra manera la migración celular, regeneración tisular y cicatrización de heridas.

5 Por lo general, dichas composiciones se pueden usar en tratamientos terapéuticos o profilácticos según necesidad. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas se pueden aplicar en forma de preparaciones terapéuticas o cosméticas para reparación de la piel, cicatrización de heridas, cicatrización de quemaduras y otros tratamientos dermatológicos.

10 Preferiblemente, el vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable de dichas composiciones es adecuado para administrar a mamíferos, y preferiblemente a los seres humanos.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender queratinocitos autólogos o alogénicos cultivados según la invención.

15

Por "*vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable*" se entiende un relleno sólido o líquido que diluye o encapsula la sustancia que se puede usar con seguridad para administración sistémica. Dependiendo de la vía de administración concreta, se puede utilizar una amplia variedad de vehículos, bien conocidos en la materia. Estos vehículos se pueden seleccionar entre un grupo que incluye azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta,

20 gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido alginico, soluciones tamponadas con fosfato, emulsionantes, disolución salina isotónica y sales como sales de ácidos minerales incluyendo clorhidratos, bromuros y sulfatos, ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos y malonatos y agua exenta de pirógenos.

25 Una referencia útil que describe vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables es Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack publishing Co. N.J. USA, 1991).

Se puede emplear cualquier vía de administración segura para proporcionar al paciente la composición farmacéutica. Por ejemplo, se puede emplear la vía oral, rectal, parenteral, sublingual, bucal, intravenosa,

30 intraarticular, intramuscular, intradérmica, subcutánea, inhalatoria, intraocular, intraperitoneal, intracerebroventricular, transdérmica y similares.

Las formas de dosificación incluyen comprimidos, dispersiones, suspensiones, inyecciones, disoluciones, jarabes, pastillas para chupar, cápsulas, supositorios, aerosoles, parches transdérmicos y similares. Estas formas de

35 dosificación pueden incluir también inyectar o implantar dispositivos de liberación controlada específicamente para este fin u otras formas de implantes modificados para actuar adicionalmente de esta forma.

Las formulaciones de liberación controlada pueden llevarse a cabo mediante revestimiento, por ejemplo con polímeros hidrófobos que incluyen resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos poliláctico y

40 poliglicólico y determinados derivados de celulosa como la hidroxipropilmetilcelulosa. La liberación controlada puede llevarse a cabo mediante el uso de otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Los ejemplos no limitantes de formulaciones y dispositivos de liberación controlada incluyen bombas osmóticas, microesferas basadas en polímero poliláctido-co-glicólido (PLG), polímeros basados en hidrogel, geles de dextrano reticulados químicamente tales como OctoDEX™ y dex-lactato-HEMA, por ejemplo.

45

Las composiciones anteriores se pueden administrar de forma compatible con la formulación de dosificación, y en la cantidad en la que sea farmacéuticamente eficaz. La dosis administrada a un paciente debería ser suficiente para conseguir una respuesta beneficiosa en un paciente durante un periodo de tiempo adecuado. La cantidad de

50 agente(s) a administrar puede depender del sujeto a tratar incluyendo edad, sexo y estado de salud general del mismo, factores que dependerán del juicio clínico del médico a cargo del paciente.

Con respecto a las composiciones farmacéuticas para la cicatrización de heridas, se hace referencia particular a la patente de los Estados Unidos 5.936.064 y a la Publicación internacional WO99/62536.

55 Las composiciones anteriormente mencionadas pueden ser adecuadas para administración *in situ* mediante pulverización. El término "*pulverización*" abarca e incluye términos tales como "*aerosol*" o "*niebla*" o "*condensado*" que por lo general describen suspensiones de líquido en forma de gotitas.

Aunque opcional, la composición del pulverizado o aerosol puede comprender además al menos un IGF

seleccionado entre IGF-I e IGF-II, o en realizaciones particulares, complejos de proteína aislados que comprenden IGF, VN e IGFBP, para estimular el crecimiento y migración de las células de la piel *in situ*. Se pueden incluir también proteínas activas biológicas tales como EGF y/o bFGF.

- 5 Sin desear vincularse a una teoría concreta, se contempla en el presente documento que la "adhesividad" inherente de la VN en los complejos de IGF presentes en la composición de pulverización anteriormente mencionada facilitará la administración de IGF-I, IGF-II y resto de factores de crecimiento tales como EGF y bFGF.

10 Típicamente, las composiciones para pulverización se pueden administrar mediante un aparato como un envase presurizado equipado con una salida para administración.

15 Un ejemplo de un sistema de administración de queratinocitos aerosolizados para por ejemplo cicatrización de heridas en un modelo de cerdo se proporciona por Navarro y col., 2000, J Burn Care Rehabil 21 513. También se hace referencia a Grant y col., 2002, Br J Plast Surg 55 219 que describen el uso de queratinocitos aerosolizados combinados con cola de fibrina para cicatrización de heridas en un modelo de cerdo.

Preferiblemente, las composiciones para pulverización están sustancialmente exentas de suero.

20 Una composición para pulverización sobre la piel puede comprender Tissomat® (Baxter Healthcare), que facilita la aplicación por pulverización de cola de fibrina y líquidos aerosolizados mediante administración en una corriente de aire comprimido de calidad médica controlado por un regulador. Son adecuadas presiones de 10-30 psi (70-207 kPa), pero se observa una disminución de la viabilidad al aumentar la presión. Las células se pueden pulverizar a concentraciones de 0,5 a 1,5 millones por mililitro. La aplicación de 0,2 mililitros de suspensión celular a 20 psi (138 kPa) es suficiente para recubrir un área de aproximadamente 25 centímetros cuadrados (basándose en los datos de 25 área superficial revestida con células tras 7 días de crecimiento *in vitro*). Preferiblemente las células se pueden administrar en medio de crecimiento exento de suero, pero también se pueden suspender en cola de fibrina como en el producto comercial Tisseel/Tissucol (Baxter Healthcare).

30 También se contempla que se puede conseguir una eficacia similar usando una administración mediante jeringuilla de la composición de la invención (por ejemplo, una jeringuilla equipada con un tapón pulverizador).

#### Usos terapéuticos

35 En aspectos particulares, la presente invención permite procedimientos para tratar quemaduras, heridas y úlceras así como procedimientos relacionados con tratamientos cosméticos para la piel para mejorar o potencial la calidad de la piel o la apariencia de la piel.

40 Estos procedimientos pueden estar especialmente dirigidos al tratamiento de mamíferos, y más particularmente, de seres humanos. Sin embargo, también se apreciará que dichos procedimientos pueden tener aplicaciones veterinarias para tratar animales domésticos, ganado y animales de espectáculo, tal como entenderá bien la persona experta en la técnica.

45 En una realización preferida, la invención proporciona un procedimiento, sistema y medio de cultivo celular para propagar queratinocitos primarios *ex vivo*, mediante el cual las células se pueden administrar a un individuo.

En realizaciones particulares, los queratinocitos son queratinocitos autólogos o alogénicos cultivados según la invención.

50 Dichos procedimientos incluyen la administración de composiciones farmacéuticas como se han definido anteriormente en el presente documento, y puede realizarse por medio de inyección con microagujas en los sitios específicos de los tejidos, como se ha descrito en la patente de los Estados Unidos 6.090.790, cremas tópicas, lociones o apósitos sellantes aplicados a las heridas, quemaduras o úlceras, tal como se ha descrito en la patente de los Estados Unidos 6.054.122 o mediante implantes que liberan la composición tal como se ha descrito en la Publicación Internacional WO99/47070.

55 También existen procedimientos mediante los cuales las células de la piel se pueden modificar genéticamente con el objetivo de crear sustitutos de la piel, tales como mediante la expresión de factores de crecimiento deseados diseñados mediante ingeniería genética (Supp y col., 2000, J. Invest. Dermatol. 114 5). Un ejemplo de una revisión en este campo se proporciona en Bevan y col., Biotechnol. Gent. Eng. Rev. 16 231.

También se contempla la "siembra" de un receptor con células transfectadas o transformadas, tal como se ha descrito en la Publicación Internacional WO99/11789.

- 5 Estos procedimientos se pueden usar para estimular la migración celular y de este modo facilitar o progresar en la cicatrización de heridas y quemaduras, reparación de lesiones de la piel tales como úlceras, sustitución de tejido e injerto tal como el cultivo *in vitro* de piel autóloga, reepitelialización de órganos internos tales como el riñón y el pulmón y la reparación de tejido nervioso dañado.
- 10 La terapia de sustitución de la piel se ha convertido en algo bien conocido en la técnica, y pueden emplearse líneas de células epiteliales/queratinocitos cultivados simultáneamente, por ejemplo, según se describe en Kehe y col., 1999, Arch. Dermatol. Res. 291 600 o en cultivo *in vitro* de células primarias (habitualmente autólogas) epidérmicas, dérmicas y/o queratinocitos. Estas técnicas también pueden utilizar biomateriales diseñados y "armazones" poliméricos sintéticos.
- 15 Ejemplos de revisiones en el campo se proporcionan en general en Terskikh y Vasiliev, 1999, Int. Rev. Cytol. 188 41 y en Eaglestein y Falanga, 1998, Cutis 62 1.
- Más particularmente, la producción de mucosa oral para sustitución útil en cirugía craneofacial se describe en Izumi y col., 2000, J. Dent. Res. 79 798. Los queratinocitos fetales y los fibroblastos dérmicos se pueden expandir *in vitro* para producir piel para injertos en el tratamiento de las lesiones de la piel, como se ha descrito en Fauza y col., J. Pediatr. Surg. 33 357, mientras que se ha demostrado que sustitutos de la piel procedentes de elementos dérmicos y epidérmicos de la piel cultivados *in vitro* sobre biomateriales derivados del ácido hialurónico son potencialmente útiles en el tratamiento de quemaduras (Zacchi y col., 1998, J. Biomed. Mater. Res. 40 187).
- 25 Los armazones poliméricos también se contemplan con el propósito de facilitar el diseño de sustitución de la piel, como se ha descrito, por ejemplo, en Sheridan y col., 2000, J. Control Release 14 91 y en Fauza y col., 1998, *más arriba*, y microesferas como agentes para administrar células de la piel a heridas y quemaduras (LaFrance y Armstrong, 1999, Tissue Eng. 5 153).
- 30 Las láminas de queratinocitos producidas típicamente para uso terapéutico son las responsables del cierre definitivo de las heridas por quemadura. Esta técnica de injerto de lámina es de aplicación a todas las lesiones por quemadura de espesor parcial y es especialmente útil en el tratamiento de heridas con elevada área superficial en las que un cierre permanente temprano tanto de la herida como del sitio donante es casi imposible sin ayuda externa. Este es el tipo de lesión responsable de la muerte de los pacientes quemados en el reciente atentado de Bali.
- 35

En la actualidad, es posible hacer crecer piel desde una biopsia de piel de un paciente del tamaño de una moneda de cincuenta céntimos suficiente para revestir un adulto completo. Este proceso de cultivo tarda 17 días.

- 40 Sin embargo, se necesita urgentemente una sustitución de la piel más temprana para reducir el trauma del paciente, el riesgo de infección, cicatrices y las actuales necesidades de sustituciones temporales de la piel más allá del injerto de piel permanente. Adicionalmente, una lámina de piel cultivada comprende muchas células de la piel, parte maduras y parte inmaduras. El simple acto de permitir que los queratinocitos cultivados alcancen la confluencia (necesario para producir láminas de piel) hace que las células pierdan prematuramente sus características primitivas, es decir, se diferencian. Cuando se aplica una lámina de piel, solo las células inmaduras son capaces de adherirse y establecerse por sí mismas sobre el paciente. Como solo se adhieren zonas pequeñas, las láminas son muy susceptibles al daño producido por la fricción o el movimiento del paciente, y en algunos casos puede dar como resultado la pérdida de todo el injerto. Además, en una lámina de injerto, cuantas más células maduras haya en la lámina, es más probable que el injerto no prenda y que las propias células no proliferen ni migren al propio lecho de la herida. Así es evidente que una aplicación más temprana de células de piel inmaduras dará como resultado un injerto que prenda mejor y la reducción de las cicatrices.
- 45
- 50

- Se puede utilizar un procedimiento de administración por pulverización o aerosol para administrar células de la piel cultivadas *ex vivo* para permitir que una zona mayor del cuerpo del paciente quede cubierta por células de la piel inmaduras mucho antes que con la tecnología existente de injertos de láminas. Esto puede hacerse incluso a los 7 días. Esto también reduciría significativamente la formación de cicatrices, el choque y la pérdida de calor, y permitiría un retorno más rápido de la función de la piel en quemaduras de espesor parcial pero también de espesor completo.
- 55

Aunque opcional, el pulverizado o aerosol administrado puede comprender adicionalmente complejos de proteína

aislados que comprenden IGF, VN e IGFBP junto a EGF y/o bFGF para estimular el crecimiento y migración de las células.

5 Las células de la propia piel del paciente (piel autóloga) y las células de la piel de donante (piel alogénica o heteróloga) se pueden hacer crecer y utilizarse para un cierre temprano de las quemaduras. Las células donantes no expresan antígenos de trasplantes, por lo que no producen una respuesta inmune en el paciente. Las células de la piel del donante, sin embargo, son eventualmente sustituidas por las células de la propia piel del paciente.

10 Aunque se prefieren las células autólogas, el uso de células alogénicas o heterólogas en una pulverización sobre la piel permitiría la aplicación inmediata a un paciente necesitado. Alternativamente, podrían cultivarse suficientes células de piel autólogas en aproximadamente siete días para uso en un pulverizador terapéutico.

15 Otro tratamiento contemplado es el tratamiento de pacientes quedamos para conseguir un cierre temprano de heridas de espesor completo, porque es difícil que la piel cultivada prenda sobre una herida que no tiene ni la capa superficial (epidermis) ni la capa profunda (dermis) de la piel. Se contempla el uso de sustitutos dérmicos en combinación con la pulverización sobre la piel para realizar un cierre temprano permanente de estas horrosas lesiones. Se contemplan sustitutos dérmicos tanto biológicos como sintéticos. Por ejemplo, un armazón dérmico desepidermizado descelularizado procedente de cadáver que comprende complejos de proteína aislados de la presente invención puede revestirse con epidermis sintética (vestido). Tras aproximadamente 7 días, los presentes  
20 inventores teorizaron que esta dermis sintética quedará fuertemente infiltrada por las células endoteliales autólogas. En ese momento, la dermis sintética se retirará y se aplicaran a la alodermis los propios fibroblastos del paciente expandidos *ex vivo*.

25 Se anticipa que la pulverización sobre la piel, y no las láminas epidérmicas, tendrá éxito ya que el sustituto dérmico actuará como un armazón que posibilite la nutrición promoviendo la migración y el anclado de las células de la piel y otras células importantes que se encuentran habitualmente sobre la piel. Esto dará como resultado que las células de piel cultivada prendan mejor en lesiones de la piel de espesor completo.

30 De este modo, para que la presente invención se entienda y se ponga pondrá en práctica más fácilmente, la persona experta debe consultar los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

35 Crecimiento de queratinocitos primarios humanos en ausencia de suero  
Materiales y procedimientos  
Concentraciones/preabsorción de factor de crecimiento en plástico para cultivo

40 Se utilizó un enfoque normalizado para añadir VN, IGF e IGFBP en todos los estudios. Se preparó plástico para cultivo por incubación durante 2 horas a 37 grados C con vitronectina 150 ng/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo exento de suero. La disolución de VN se retira a continuación y se sustituye con medio de cultivo exento de suero que contenía IGFBP (250 ng/cm<sup>2</sup>), IGF-I (50 ng/cm<sup>2</sup>) y EGF (50 ng/cm<sup>2</sup>). Los factores de crecimiento se dejaron durante la noche a 4 grados C (en la nevera) para absorber el plástico tratado con VN. Al día siguiente, la disolución de factor de crecimiento se retiró y se sustituyó con medio de crecimiento (definido más adelante) que contenía 50 ng/ml de VN,  
45 50 ng/ml de IGFBP, 15 ng/cm de IGF-I y 15 ng/cm de EGF. Las células se añadieron a las densidades que se indican a continuación. El medio se cambia habitualmente una vez cada 3 días. Cada cultivo se hace crecer durante aproximadamente 6 días antes del paso: es decir, hay un plazo de aproximadamente 6 días entre pasos.

#### Medio de crecimiento

50 El medio base es una mezcla 3:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con medio F12 de Ham que se suplementa rutinariamente con L-glutamina (2 mM), toxina colérica (0,1 µg/ml), adenina (180 PM), hidrocortisona (0,4 µg/ml), y una mezcla de aminoácidos no esenciales (1% v/v).

55 El medio de control positivo contiene un suplemento de suero fetal bovino al 10%, insulina (5 µg) y factor de crecimiento epidérmico (EGF, 10 ng/ml).

#### Densidades de siembra

Los cultivos se hicieron crecer en presencia de células 3t3 de ratón con el crecimiento detenido a una densidad de  $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ . Las células 3t3 se volvieron "de crecimiento detenido" mediante irradiación gamma inmediatamente antes del uso.

- 5 Los queratinocitos se sembraron a dos densidades diferentes dependiendo del número de paso. Los cultivos iniciales (P0) se establecieron por siembra de células a  $3,8 \times 10^4/\text{cm}^2$ . Los cultivos posteriores (P1, P2 etc.) se establecieron por resiembra de células cosechadas a una densidad de  $6,4 \times 10^3/\text{cm}^2$ . La mayor densidad de siembra se utilizó para los cultivos P0 ya que solo una fracción de las células recientemente cosechadas mostrará proliferación continua durante el cultivo. De esta forma, el cultivo de las células permite la expansión de la subpoblación en proliferación.

#### Resultados

Comparación de cultivos con el medio de crecimiento convencional que contiene suero.

- 15 En referencia a la Fig. 1, este gráfico muestra el crecimiento promedio de queratinocitos recientemente aislados con VitroGro (células +3t3) respecto al método convencional en el que está presente tanto suero bovino como células +3t3. P0, P1 y P2 respecto al número de veces que las células se han recogido y vuelto a plaquear (P0 = rendimiento de las células inmediatamente tras aislado de una muestra de piel). Los datos se obtuvieron mediante tinción con MTT. Los datos mostraron que el cultivo en presencia de complejos de proteína aislados en ausencia de suero alcanzó consistentemente al menos un 90% del crecimiento celular conseguido en presencia de suero al 10%.

- 20 En referencia a las Figs. 2A y 2B, las células de piel que han crecido sobre VitroGro muestran un aspecto similar a las que han crecido en presencia de suero fetal bovino (Figura 2A). En la actualidad se está llevando a cabo una comparación más detallada basada en la presencia de marcadores moleculares para confirmar esta conclusión. Las técnicas empleadas incluirán procedimientos de inmunocitoquímica, análisis por clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), transferencia western, y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El uso de tecnologías punta como la proteómica y las matrices génicas también está en consideración. Los marcadores principales para investigación incluirán citoqueratinas (CK1 y CK10, CK6, CK14, y CK19) y posibles marcadores celulares de progenitores de queratinocitos (por ejemplo p63,  $\alpha 9$ -integrina,  $\alpha 6$ -integrinbri/CD71dim). Se pondrá especial atención en la comparación de la expresión de posibles marcadores celulares de progenitores ya que es posible que estos confieran eficacia clínica en injertos tras cultivo. Adicionalmente, también se pueden estudiar las respuestas de las células en ensayos funcionales rutinarios *in vitro* (adhesión, migración, proliferación).

- 35 Actividad relativa de los complejos de proteína aislados que contienen IGFBP3 o IGFBP5

En referencia a la Fig. 3, es evidente que los complejos de proteína aislados que contienen IGFBP5 fueron más eficaces que los complejos que contenían IGFBP3 en términos de rendimiento de queratinocitos.

#### 40 Ejemplo 2

Crecimiento de queratinocitos primarios humanos en ausencia de suero con y sin células alimentadoras

#### Materiales y procedimientos

- 45 Cultivo de queratinocitos primarios

- Los queratinocitos se aislaron de piel adulta humana utilizando procedimientos normalizados esencialmente análogos a los informados inicialmente por Rheinwald y Green, 1977, Nature 265 421. En resumen, esto implica la digestión de la muestra de piel durante una hora a  $37^\circ \text{C}$  en disolución Dispasa II. El epitelio recuperado se digirió posteriormente durante 10 minutos más a  $37^\circ \text{C}$  con tripsina al 0,25%/EDTA al 0,02% para disociar las células. La actividad residual de la tripsina se inactivó, y las células recuperadas se lavaron seguidamente y se sembraron simultáneamente en placas para cultivo de tejido en presencia de fibroblastos 3T3 de ratón irradiados de manera letal. Las células de "control", cultivadas usando las mismas condiciones estandarizadas, se hicieron crecer en medio DMEM/F12 suplementado con suero de ternera fetal al 10%, disolución al 0,1% de penicilina-estreptomicina, 55 hidrocortisona  $0,4 \mu\text{g}/\text{ml}$ , toxina colérica  $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $10 \text{ ng}/\text{ml}$  de factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (EGF), insulina  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , transferrina  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , y triyodotironina  $2 \text{ nM}$ , mientras que las células tratadas con complejos de factor de crecimiento aislado usaron medios idénticos excepto en que no contenían insulina. La insulina no se incluyó en los medios usados combinados con los tratamientos con complejo de proteína aislada para minimizar la unión competitiva de la insulina al receptor de IGF tipo 1. Las células cultivadas en placas revestidas

con complejos de factor de crecimiento aislado también se diferencias de las cultivadas según el procedimiento estandarizado en que se sembraron en placas sin fibroblastos de ratón irradiados.

#### Ensayo de síntesis de proteínas

- 5 Los queratinocitos se derivaron de una biopsia de piel de adulto y se expandieron hasta paso 2 mediante procedimientos estandarizados que incorporaban medio de Green, suero y células alimentadoras. Estas células se evaluaron posteriormente para la estimulación de síntesis de proteínas en presencia y ausencia de complejos IGF + VN. Aquí, las placas de 24 pocillos se revistieron durante 2 horas con 300 ng de vitronectina y luego se lavaron para
- 10 eliminar la vitronectina no unida. A continuación, los pocillos se incubaron con los factores de crecimiento a examinar, es decir; factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos básico, factor de crecimiento tipo insulina I y factor de crecimiento tipo insulina II, en combinación con la proteína 5 de unión al factor de crecimiento tipo insulina; estos se agregaron a los pocillos y se dejaron unir a la vitronectina durante toda la noche. Al día siguiente, los pocillos se lavaron dos veces para eliminar todo factor de crecimiento no unido y las
- 15 placas se dejaron secar. A continuación, los queratinocitos se cosecharon y sembraron a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) exento de suero junto a 1 uCi/pocillo de [ $^3$ H]-leucina. En los pocillos seleccionados, las células se sembraron en medio definido para queratinocitos (DKM) (Invitrogen), un producto comercial para el cultivo de queratinocitos exento de suero. A continuación, las placas se incubaron durante 48 horas y a continuación se lavaron para eliminar la [ $^3$ H]-leucina no incorporada. La
- 20 incorporación de [ $^3$ H]-leucina a las proteínas recientemente sintetizadas se determinó muestreando el precipitado solubilizado de proteína para someterlo a recuento mediante betacentelleo.

#### Ensayo MTT-Esta

- 25 Se aislaron queratinocitos humanos y se establecieron los cultivos mediante técnicas de cultivo estandarizadas de medio de Green completamente suplementado con una capa alimentadora de células 3T3 de ratón irradiados de manera letal. Las células se expandieron a paso 3 y se sembraron en placas de 24 pocillos en medio de Green en presencia o ausencia de suero de ternera fetal (FCS) y células 3T3. En tratamientos seleccionados, los pocillos se revistieron con complejos de proteína aislados. Los pocillos se incubaron con 300 ng de vitronectina durante 2 horas
- 30 y posteriormente se aspiraron antes de la adición de IGF-I e IGFBP3 o IGFBP5, o IGF-II. Las placas se incubaron durante toda la noche y se aspiraron antes de sembrar las células. Los cultivos se evaluaron respecto de la actividad metabólica medido usando el ensayo MTT-esta como se ha descrito anteriormente (Ealey y col. 1988, J Mol Endocrinol 1:R1-R4.).

#### 35 Resultados

- A la vista de la respuestas funcionales potenciadas significativas obtenidas con los complejos de factor de crecimiento aislado en líneas celulares (Publicación Internacional WO 02/24219; Noble y col., 2003, *más arriba*), Krickler y col., 2003, *más arriba*) los inventores recientemente extendieron sus estudios a los cultivos de
- 40 queratinocitos derivados de piel adulta. En particular, examinaron el potencial de los complejos de factor de crecimiento aislado para sustituir el suero y las células alimentadoras utilizados en las actuales prácticas clínicas para la expansión *ex vivo* de queratinocitos en autoinjertos de espesor dividido. Aunque este procedimiento ha hecho avanzar significativamente las terapias disponibles para pacientes quemados, el cultivo de queratinocitos derivados de pacientes se lleva a cabo en presencia de suero fetal bovino (FBS), un producto xenobiótico
- 45 semidefinido que es una fuente potencial de patógenos. Adicionalmente, en las primeras etapas de la derivación y establecimiento de queratinocitos se utiliza una capa alimentadora de células derivadas de una segunda especie, más concretamente fibroblastos murinos 3T3, como fuente de citocinas y elementos de la matriz para estimular la adhesión y crecimiento celular. El FBS también contribuye a estos efectos.
- 50 Como (i) los IGF representan una gran parte de las citocinas segregadas por las células alimentadoras; (ii) los inventores han establecido que la VN sustituye toda necesidad de suero para facilitar la adhesión de los queratinocitos primarios cultivados sembrados a baja densidad sobre material plástico; y iii) los efectos obtenidos por los inventores en líneas celulares de queratinocitos cultivados sobre complejos de factor de crecimiento aislado son equivalentes a los obtenidos con medio que contiene FBS al 10%, los autores teorizan que el complejo de factor de
- 55 crecimiento aislado-medio suplementado tiene el potencial de proporcionar un producto superior dirigido a aplicaciones de diseño de queratinocitos autólogos. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que los IGF son mitógenos clave que estimulan la proliferación de queratinocitos, ya que los propios queratinocitos no segregan el IGF-I. Aunque se han desarrollado comercialmente medios exentos de suero como KGM™ (Clonetics) y EpiLife™ (Sigma-Aldrich) para la expansión de queratinocitos, estos medios requieren la adición de extracto de pituitaria

bovina, que también es una fuente de patógenos xenobiótica potencial indefinida, o alternativamente, la adición de suplementos caros. Además, las aplicaciones más actuales para cultivo de queratinocitos exenta de suero demandan densidades de siembra muy elevadas que anula el objetivo de cultivar rápidamente grandes cantidades de queratinocitos y es parte de la mala adopción de estas prácticas en las aplicaciones clínicas rutinarias.

- 5 Los inventores han probado directamente sus hipótesis y los resultados se muestran en la Figura 4. En este experimento, los queratinocitos se derivaron de piel adulta y se establecieron mediante los procedimientos habituales durante 7 días. A continuación, las células se pasaron por tripsinización y se sembraron a baja densidad (8.500 queratinocitos/cm<sup>2</sup>) sobre plástico para cultivo de tejido revestido de complejos de factor de crecimiento aislado y se hicieron crecer en ausencia de células alimentadoras, y sin nada de FBS ni insulina (FIG. 4) durante 7 días más. Se encontró que las células que crecían en esas condiciones se expandían más rápidamente que las que habían crecido mediante la mejor práctica clínica actual (es decir, crecimiento en presencia de FBS y fibroblastos alimentadores 3T3 de ratón; FIG. 4). Los bordes de la colonia que había crecido en presencia de complejos de proteína aislados demostró la presencia de queratinocitos que podían crecer hacia el exterior, estaban sanos y en proliferación. Las células más internas representadas en la FIG. 4 muestran la morfología típica de pavimento observada en los cultivos de queratinocitos cerca de la confluencia, en este caso, la confluencia se obtuvo en solo 7 días. La cuantificación de la proliferación de queratinocitos en presencia de estos complejos de proteína mediante ensayos MTT confirma estos hallazgos (FIG. 4B).
- 20 Los datos posteriores tienen a sugerir que la capacidad de los queratinocitos para crecer bien en ausencia de células alimentadoras (también sin suero) está restringida a las últimas etapas del cultivo celular ya que las células alimentadoras parecen ser importantes para el establecimiento de los cultivos a partir de las biopsias iniciales.

- El efecto de los factores de crecimiento adicionales EGF y bFGF se demuestra en la FIG. 5. Los autores examinaron queratinocitos de piel humana en paso 3 (derivados de una biopsia de piel de adulto) y se evaluó la estimulación de la síntesis de proteína mediante complejos suplementados con IGF + VN durante 48 h. Estos tratamientos se ensayaron en paralelo con células que se habían hecho crecer en medio definido para queratinocitos (DKM) (Invitrogen), un producto comercial para el cultivo de queratinocitos exento de suero que contenía cantidades indefinidas de insulina, EGF y bFGF. Se encontró que el DKM estimulaba un aumento en la síntesis de proteínas en un 148% sobre los pocillos de control (-VN), que fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el efecto de la VN sola (+VN) o la ausencia de VN y factores de crecimiento (-VN). Los complejos diméricos IGF-II + VN y triméricos IGF-II + VN + IGFBP-5 estimularon también significativamente la síntesis de proteínas en un 134% y 161% respectivamente ( $p < 0,05$ ). Así, no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la estimulación de la síntesis de proteínas observada para el DKM, los complejos diméricos y triméricos, indicando que ambos complejos son tan eficientes para estimular la síntesis de proteínas de los queratinocitos como el producto comercial DKM.

- Cuando se añadieron EGF, bFGF, o ambos factores de crecimiento combinados se agregaron al complejo trimérico, se observaron aumentos del 216%, 248% y 213%. Todas estas respuestas fueron significativamente mayores que las de ( $p < 0,05$ ). De la misma forma, cuando EGF, o ambos EGF o bFGF, se añadieron a los complejos diméricos, se obtuvieron aumentos significativos de la síntesis de proteínas de 192% y 198% respectivamente, que también resultaron significativamente más elevados que las obtenidas con el DKM ( $p < 0,05$ ). Estos resultados destacan que la incorporación de EGF o bFGF a los complejos de proteína aislado estimulan un aumento en la síntesis de proteínas superior al obtenido con el producto comercial para el cultivo de queratinocitos exento de suero y exento de células alimentadoras.

45

### Ejemplo 3

Tecnología de pulverización sobre la piel

Materiales y procedimientos

50

En este punto se resuelven dos cuestiones. En primer lugar, se produce un número suficiente de células in vitro para posibilitar la aplicación de suspensiones celulares pulverizadas en el plazo de una semana. Esta técnica es por tanto consistente con lo que ya se utiliza comercialmente (Clinical Cell Culture Ltd), pero tiene la ventaja de estar exenta de suero. En segundo lugar, las células que han crecido sobre VitroGro siguen siendo viables tras la pulverización. El sistema de administración usado por los inventores es Tissomat® (Baxter Healthcare). El sistema de administración Tissomat está diseñado para aplicación mediante pulverización de cola de fibrina y líquidos aerosolizados mediante administración en una corriente de aire comprimido de calidad médica controlado por un regulador. Sin embargo, es también expectativa de los inventores poder alcanzar resultados similares mediante procedimientos de pulverización alternativos (jeringuilla equipada con un tapón pulverizador). Son adecuadas

55

presiones de 10-30 psi (70-207 kPa), pero se observa una disminución de la viabilidad al aumentar la presión. Las células se pueden pulverizar a concentraciones de 0,5 a 1,5 millones por mililitro. La aplicación de 0,2 mililitros de suspensión celular a 20 psi (138 kPa) es suficiente para recubrir un área de aproximadamente 25 centímetros cuadrados (basándose en los datos de área superficial revestida con células tras 7 días de crecimiento *in vitro*). Las células se pueden administrar en medio de crecimiento exento de suero, pero también se pueden suspender en cola de fibrina como en el producto comercial Tisseel/Tissucol (Baxter Healthcare). Los estudios de los inventores indican que la cola de fibrina debe ajustarse antes del uso por dilución hasta condiciones isotónicas con agua estéril para inyección y después ajustar los componentes finales de la cola de fibrina con disolución salina estéril a 1-10 mg/ml para el fibrinógeno y 10-100 unidades/ml para la trombina.

10

## Resultados

La FIG. 6 muestra la distribución celular y administración por pulverización de los factores de crecimiento de queratinocitos en placas de cultivo de 150 mm de diámetro revestidas con colágeno. De forma importante, las células que han crecido sobre VitroGro muestran una buena viabilidad tras la pulverización. Las células se pulverizaron a dos concentraciones diferentes para determinar los números de células necesarios para recubrir el área pulverizada. Los cultivos usados en la pulverización se hicieron crecer originalmente en control (con suero) o vitronectina con IGFBP3 e IGF-I. Todos los cultivos se prepararon en presencia de células 3t3. Tras la pulverización, las células se hicieron crecer en presencia de suero para imitar las condiciones que posiblemente iban a experimentar en el lecho de la herida. Los cultivos se tiñeron con violeta de cristal para demostrar la distribución celular.

Como se muestra en la Figura 7, puede observarse los efectos de pulverizar los queratinocitos cultivados con el sistema de administración Tissomat. Para estos experimentos preliminares, los cultivos se establecieron usando el medio de cultivo convencional con adición de suero y células alimentadoras. En la FIG. 7A, Se llevó a cabo la prueba de exclusión con azul Tripán a los minutos de pulverizar las células en el interior de un tubo de recogida, que se basa en el principio que las células viables son no permeables al colorante. Como puede observarse en la FIG. 7B, los datos de conversión MTT son una medida de la viabilidad más robusta ya que proporciona una indicación de la actividad metabólica 24 horas tras pulverizar las células.

30

En ambas FIGS. 7A y 7B, puede observarse que la presión óptima de administración es de 10-20 psi (70-138 kPa), aunque la viabilidad sigue siendo aceptable a una presión de administración de 30 psi (207 kPa).

## Ejemplo 4

35

Ensayo clínico de pulverización sobre la piel

Recogida de una biopsia de piel

Se seleccionará un sitio donante adecuado y se preparará por afeitado e impregnación con desinfectante. Se retirará un injerto de piel de espesor dividido de aproximadamente 10 centímetros cuadrados de área en el quirófano con anestesia local. La biopsia se colocará en disolución salina estéril con antibióticos y se llevará inmediatamente al laboratorio de cultivo de piel para procesamiento. El sitio donante se cubrirá con Opsite u otro apósito según el juicio clínico del cirujano a cargo del paciente.

45

Aislamiento y cultivo de queratinocitos

Tras su llegada a la instalación de cultivo de tejido, cada biopsia de paciente se lavará con tampón estéril y se incubará durante 1 hora a temperatura ambiente en antibióticos para reducir la posibilidad de contaminación durante el cultivo posterior. Las capas epidérmica y dérmica se separarán por digestión con tripsina. Las caras opuestas del tejido separado se rascarán, y las células desalojadas (predominantemente queratinocitos basales) se lavarán y suspenderán suspendidas en medio de cultivo exento de suero que contenga inhibidor de tripsina de soja. La suspensión celular final se sembrará en una frasco para cultivo de tejido de 25 cm<sup>2</sup> que contiene fibroblastos 3t3 de ratón con el crecimiento detenido (2,5 x 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>) y 5 ml de medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con vitronectina (VN, 50 ng/cm<sup>2</sup>), factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I, 15 ng/cm<sup>2</sup>), proteína de unión 5 al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP5, 50 ng/cm<sup>2</sup>), factor de crecimiento epidérmico (EGF, 15 ng/cm<sup>2</sup>), adenina (180 μM, toxina colérica (0,1 μg/ml), L-glutamina (2 mM), hidrocortisona (0,4 μg/ml) y aminoácidos no esenciales (1% v/v). Los frascos de cultivo se pretratarán con VN (300 ng/cm<sup>2</sup>), IGF-I (100 ng/cm<sup>2</sup>), IGFBP5 (500 ng/cm<sup>2</sup>) y EGF (100 ng/cm<sup>2</sup>) para estimular la preabsorción de los complejos de proteína. Se aplicará medio fresco tras 3 días de cultivo. Tras 6

días de cultivo, se retirarán las células 3t3 por incubación en disolución salina que contiene EDTA. Los queratinocitos restantes se cosecharán por incubación adicional con Tripsina/EDTA y se lavarán en disolución salina que contenga inhibidor de tripsina de soja. Las células recuperadas se ajustarán a una concentración de  $2 \times 10^6$ /ml y se llevarán al quirófano en disolución salina que contenga albúmina de suero humana al 0,2%.

5

Preparación y administración de la suspensión de queratinocitos

- Se descongeló el TISSEEL Duo 500® de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes poniéndolo a 37° C. Una vez descongelado, se retiraron las jeringuillas de fibrinógeno y trombina de sus alojamientos respectivos y se dispensarán en tubos de plástico estériles. El componente de fibrinógeno se diluirá 1:1 con agua estéril para inyección seguido por una dilución 1:4 adicional con la suspensión de depósito de células del paciente ( $2 \times 10^6$  células/ml, tal como se ha preparado en el paso 2). El componente de trombina se diluirá 1:0,25 (es decir 4:1) con agua estéril para inyección. Se cargará un volumen igual de cada componente modificado (fibrinógeno + células, y trombina) en jeringuillas independientes de 1 ml y se conectaron al TISSOMAT mediante una boquilla pulverizadora Duploject. Durante la aplicación, las dos jeringuillas de presionaron uniformemente dando como resultado una mezcla 1:1 de cada componente. De esta forma, las concentraciones finales serán:  $0,8 \times 10^6$  células/ml, 170 IU/ml de trombina, y 4,7 mg/ml de fibrinógeno en el producto pulverizado. Aproximadamente 0,5 ml de la solución combinada se administrará secuencialmente desde una altura de 10 cm a 20 psi (138 kPa) a cada 20 cm<sup>2</sup> de herida de espesor dividido. De este modo, la densidad de sembrado promedio de las células aplicadas será de  $0,2 \times 10^5$ /cm<sup>2</sup>. La altura e intervalo de cada pulverización será de aproximadamente la anchura de una mano (altura) y la anchura combinada de tres dedos (intervalo). Las heridas tratadas se crearán en el curso de realizar un autoinjerto rutinario de espesor dividido (tratamiento de quemaduras o liberación de contracturas). Aproximadamente la mitad de cada herida se cubrirá con una máscara estéril durante el rociado para servir como control no tratado. Se pueden usar dos sitios donantes: uno tratado y uno dejado sin tratamiento. Cada herida se fotografiará tanto antes como después de aplicar la suspensión celular. Las heridas tratadas se cubrirán con apósito de silicona Opsite.

La evaluación y cuidados clínicos postquirúrgicos se realizarán según los protocolos establecidos.

### Ejemplo 5

30

Crecimiento y migración de células derivadas de ORS

- Los cultivos de vaina exterior de la raíz primaria (ORS) se derivarán de folículos pilosos en fase anágena recogidos del cuero cabelludo de pacientes diabéticos que hayan otorgado su consentimiento, y se cultivaron usando los procedimientos descritos en Limat y Hunziker, 2002, Cells Tissues Organs 172 79-85 y Publicación internacional WO 01/59442. Las células se expandieron *ex vivo* usando una capa preformada de fibroblastos dérmicos postmitóticos y medio suplementado con suero de ternera fetal como se ha descrito anteriormente para los queratinocitos derivados de la piel. Los cultivos se mantendrán en un estado subconfluyente durante un máximo de tres pasos, y se examinó la evaluación morfológica y funcional del crecimiento de las células en presencia de complejos de proteína aislados en ausencia de suero y células alimentadoras.

Se probarán los complejos particulares considerados óptimos para el crecimiento de queratinocitos derivados de la piel.

- Tras haber establecido que las células progenitoras de queratinocitos derivadas de ORS expandidas *ex vivo* crecen y migran en presencia de los complejos de proteína aislados, se determinará a continuación si la derivación inicial de las células de las ORS en fase anágena y el posterior cultivo primario también se puede llevar a cabo en condiciones exentas de suero y células alimentadoras. Así, los folículos de ORS en fase anágena se explantarán en membranas microporosas de insertos de cultivos celulares y en lugar de revestir la parte inferior de los insertos de membrana con una capa alimentadora de fibroblastos dérmicos postmitóticos, en su lugar la parte inferior se revestirá con complejos de proteína aislados. Las células se harán crecer en medio exento de suero solo, o medio suplementado con suero autólogo obtenido a del paciente, o medio que contiene los complejos de proteína aislados. Se comparará la tasa de crecimiento de las células derivadas de ORS crecidas en presencia de complejos de proteína aislados con la de las células crecidas en insertos utilizando procedimientos convencionales.

55

También se prepararán equivalentes epidérmicos por exposición de las células al aire, como han descrito Limat y Hunziker, 2002, *más arriba*, y se caracterizaron mediante criterios histológicos, ultraestructurales (por ejemplo, estructura tipo membrana basal, gránulos queratohialinos, queratinosomas) e inmunohistoquímicos (por ejemplo, queratinas, integrinas, gp80, involucrina, filagrina). Si tiene éxito, el uso de células progenitoras derivadas de ORS

con este factor de crecimiento + tecnología VN no solo reducirá de forma significativa los costes de fabricación, sino que potenciará la seguridad, y acelerará los aspectos normativos asociados con la aprobación de terapias basadas en células

## 5 Ejemplo 6

### Preparación de vitronectina purificada

- VN autóloga de sangre purificada del paciente (presente típicamente a 0,4 mg/ml) se utilizará para soportar el crecimiento *ex vivo* de los propios queratinocitos del paciente. Los inventores evaluarán los anticuerpos monoclonales producidos contra la vitronectina y que se han utilizado con éxito para purificar la vitronectina a partir de suero humano (Underwood y col., 2001, J Immunol Methods. 247 217-24). Los anticuerpos monoclonales seleccionados para la evaluación se acoplarán a la matriz de purificación soporte usando metodologías similares a las descritas para purificar la VN del suero. En este punto los inventores estiman que se necesitarán 0,25 mg de VN para cultivar 1 m<sup>2</sup> de células de paciente y esto se debe conseguir fácilmente a partir de 20 ml de sangre del paciente. El procedimiento de purificación de Underwood y col., 2001, *más arriba*, se modificará poniendo énfasis en la mínima manipulación y en la simplicidad: el objetivo es desarrollar una matriz de purificación por afinidad desechable que requiera idealmente solo 2-3 etapas de lavado. Como la VN procederá del propio paciente, la necesidad de VN pura disminuye, siempre que la VN obtenida sea capaz de seguir estimulando el crecimiento celular con eficacia. Así, la VN purificada usando los protocolos desarrollados se evaluará por su eficacia en el estímulo del crecimiento de queratinocitos así como por análisis bioquímicos normalizados tales como SDSPAGE, secuenciación de la proteína del extremo N, análisis de masas con electropulverización, unión a IGF e IGFBP- , y esto se comparará con VN adquirida de Promega Pty. Ltd.
- En toda esta memoria descriptiva, el objetivo ha sido describir las realizaciones preferidas de la invención sin limitar la invención a ninguna realización o colección concretas de características. Los expertos en la técnica apreciarán sin embargo, a la luz de la presente memoria descriptiva, que se pueden realizar varias modificaciones y cambio en las realizaciones particulares a modo de ejemplo sin separarse del ámbito de la presente invención según se ha definido en las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un medio de cultivo para células epiteliales de mamífero que comprende:
- 5 (i) al menos un IGF seleccionado entre IGF-I e IGF-II en donde, cuando IGF-I está presente de manera diferente a una quimera sintética IGF-I/VN, el medio de cultivo comprende una proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP) seleccionado entre IGFBP3 o IGFBP5;
- (ii) vitronectina (VN) o al menos un fragmento de unión al receptor de la integrina de la misma;
- (iii) una o más proteínas activas biológicas distintas que estimulan el crecimiento y/o la diferenciación celular;
- y
- 10 (iv) una ausencia de suero o una cantidad de suero que en ausencia de IGF-I o IGF-II no soportaría el crecimiento de células epiteliales.
2. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de la reivindicación 1, en el que el suero está presente hasta una concentración no superior al 1% (v/v).
- 15 3. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de la reivindicación 1, en el que el suero está presente hasta una concentración no superior al 0,5% (v/v).
4. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de la reivindicación 1, en el que el suero está presente hasta una concentración no superior al 0,1% (v/v).
- 20 5. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de la reivindicación 1, en el que el suero está ausente.
- 25 6. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fragmento de VN no comprende un dominio de unión a heparina (HBD).
7. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fragmento de VN comprende una región polianiónica.
- 30 8. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el receptor de la integrina es un receptor de la integrina  $\alpha_v$ .
9. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el receptor de la integrina se selecciona entre una  $\alpha_v\beta_3$  integrina o una  $\alpha_v\beta_5$  integrina.
- 35 10. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende IGF-I, una IGFBP-3 o IGFBP-5 y VN en la forma de un complejo de proteína aislado y/o que comprende IGF-II y VN en forma de un complejo de proteína aislado.
- 40 11. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de la reivindicación 1, en el que dicho IGF y dicha VN o dicho fragmento de la misma están presentes en forma de un complejo de proteína aislado que es una proteína química sintética.
- 45 12. El medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha una o más proteínas activas biológicas adicionales son EGFEGF y/o bFGF.
13. Uso del medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para cultivar células epiteliales.
- 50 14. Un sistema de cultivo de células epiteliales humanas que comprende un recipiente de cultivo y el medio de cultivo de células epiteliales de mamífero de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
15. El sistema de cultivo de células epiteliales de mamífero de la reivindicación 14, que comprende VN y/o fibronectina, o un fragmento de las mismas, inmovilizadas, unidas o asociadas de cualquier otra forma con el recipiente de cultivo.
- 55 16. Un procedimiento para cultivo de células epiteliales de mamífero que incluye la etapa de cultivar una o más células epiteliales de mamífero en el sistema de cultivo de células epiteliales de mamífero de la reivindicación

14 o la reivindicación 15.

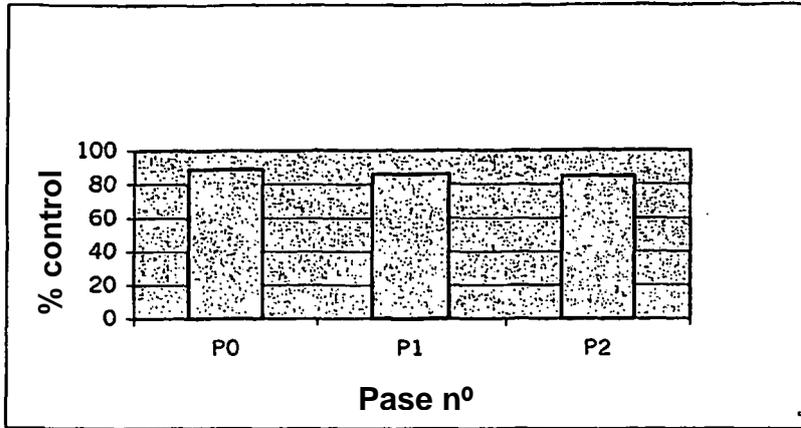
17. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que las células alimentadoras están ausentes durante al menos parte de la duración del cultivo.

5

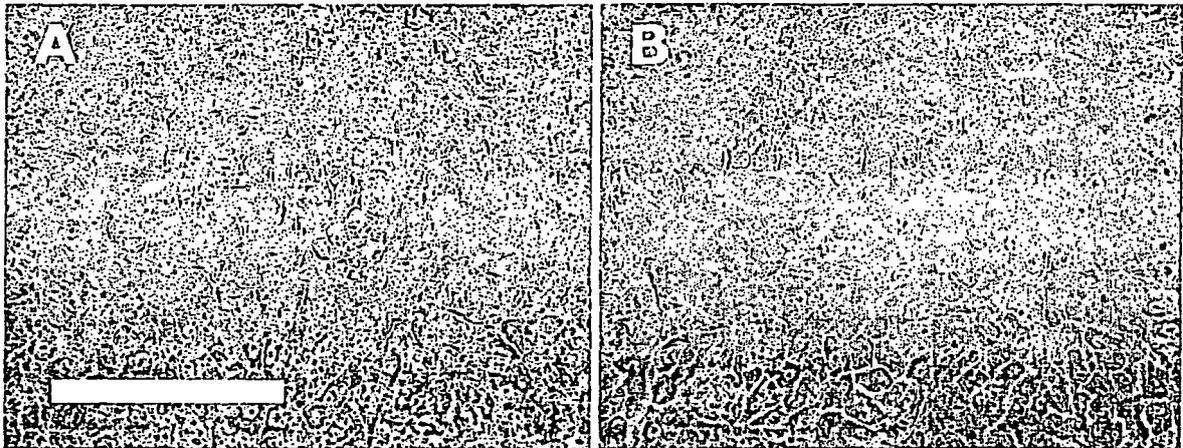
18. El procedimiento de la reivindicación 16, en el que la una o más células epiteliales de mamífero son queratinocitos o progenitores de queratinocitos.

19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que una o más células son células del epitelio córneo.

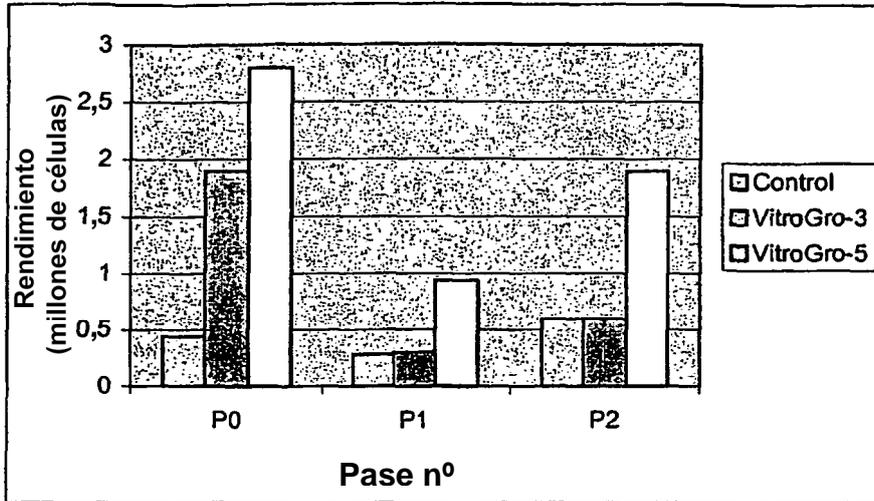
10



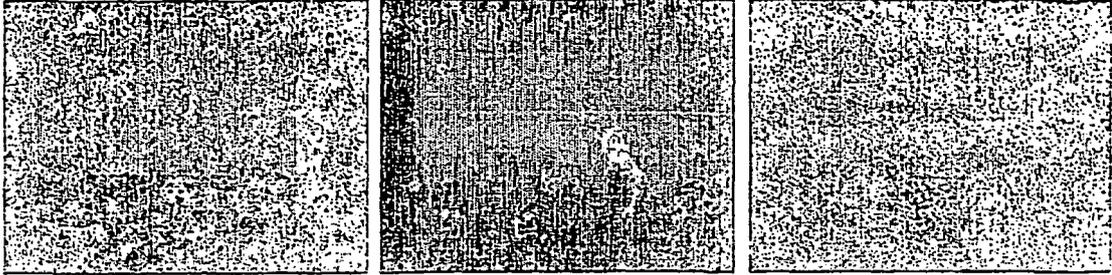
**FIG. 1**



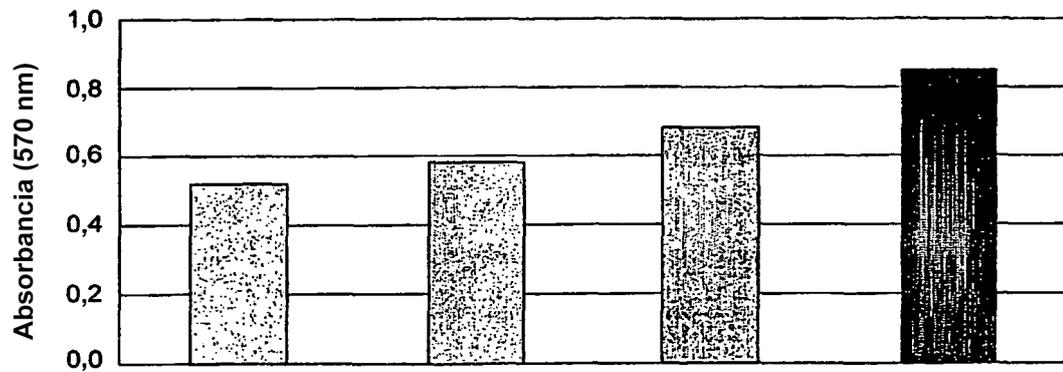
**FIG. 2**



**FIG. 3**

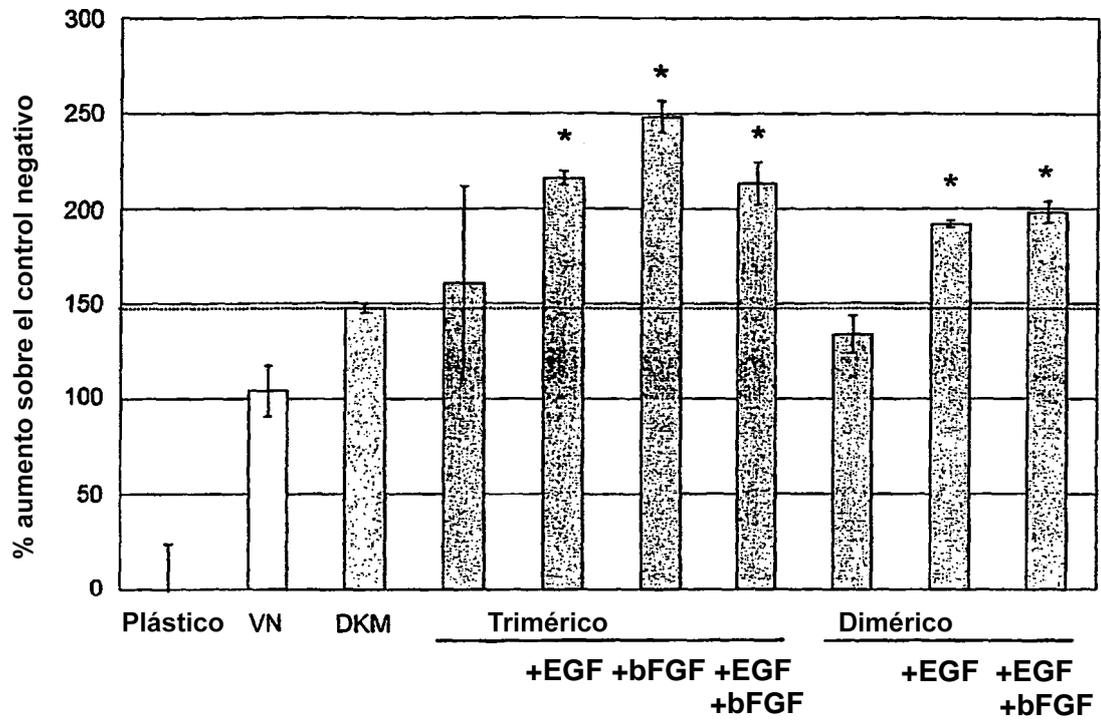


a)

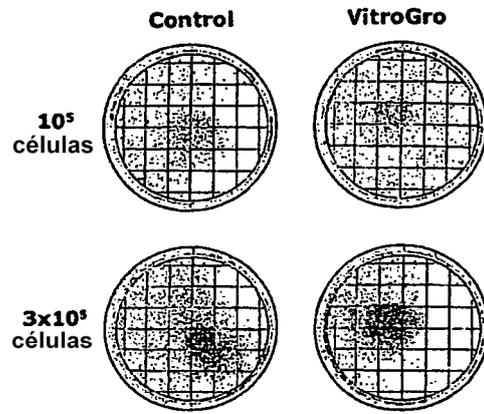


b)

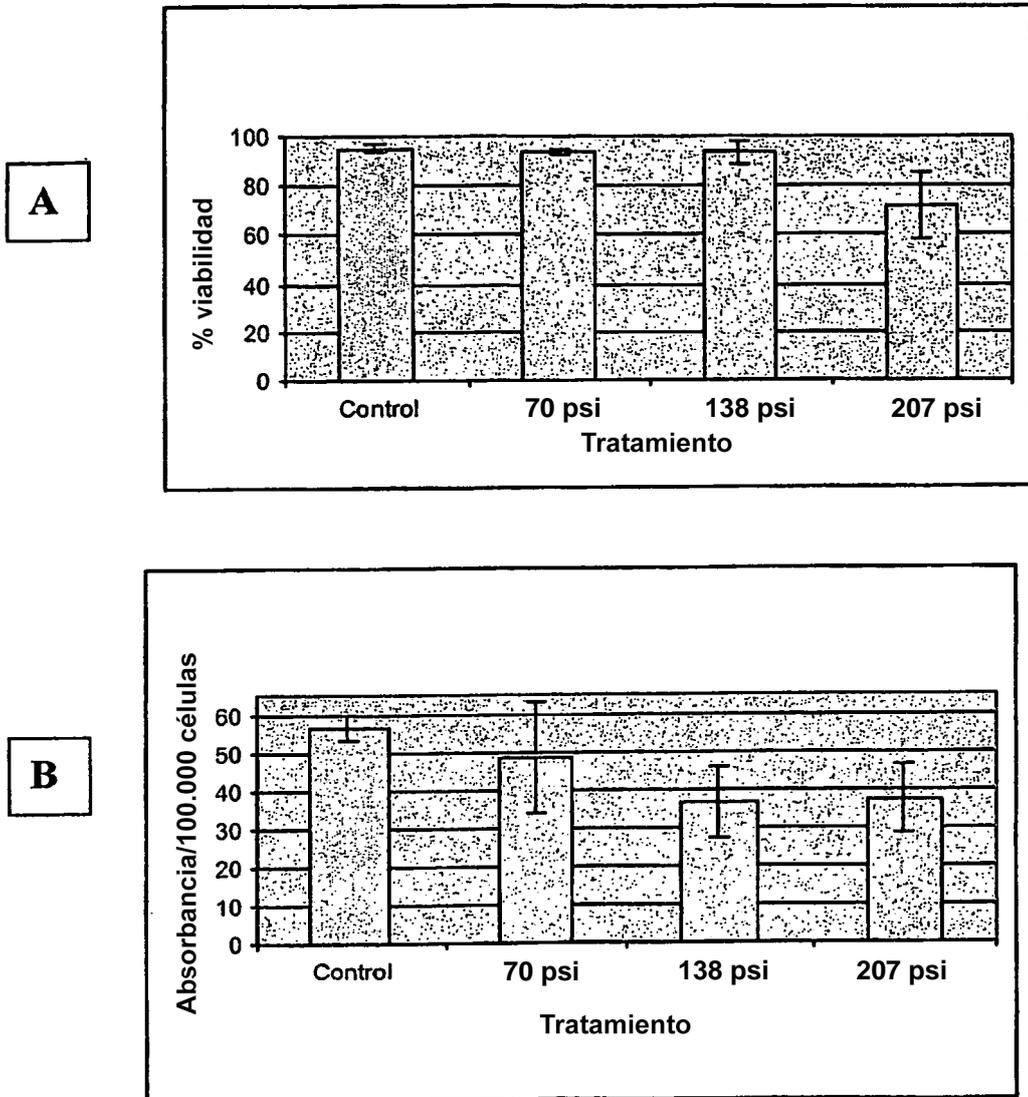
**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**