

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 253**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/07** (2010.01)  
**C12N 5/071** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01945763 .9**  
96 Fecha de presentación: **02.07.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1312669**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2003**

54 Título: **LÁMINA CELULAR EPIDÉRMICA CULTIVADA, LÁMINA CUTÁNEA CULTIVADA MULTICAPA Y PROCESO PARA PRODUCIR LAS MISMAS.**

30 Prioridad:  
**21.07.2000 JP 2000221383**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.11.2011**

73 Titular/es:  
**CELLSEED INC.**  
**33-8, Wakamatsu-cho, Shinjuku-ku,**  
**Tokyo 162-0056 , JP**

72 Inventor/es:  
**OKANO, Teruo;**  
**YAMATO, Masayuki;**  
**UTSUMI, Mika;**  
**KUSHIDA, Ai;**  
**KONNO, Chie y**  
**KIKUCHI, Akihiko**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 369 253 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

Lámina celular epidérmica cultivada, lámina cutánea cultivada multicapa y proceso para producir las mismas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un proceso para producir una lámina cutánea cultivada multicapa y el uso de un método terapéutico de esas láminas.

10 **Antecedentes de la técnica**

15 Cuando se produce daño en la piel tal como quemaduras, debe tenerse mayor cuidado acerca de infecciones bacterianas de la piel lesionada por quemadura y similares. La piel muerta es particularmente susceptible de proliferación extensiva de diversos gérmenes. Por lo tanto, la piel muerta debe retirarse para asegurar que no proliferarán diversos gérmenes. Sin embargo, la retirada de la piel proporciona un sitio para infección bacteriana. Para prevenir dicha infección bacteriana, el sitio del que se ha retirado la piel debe enmascarse con un material adecuado para evitar la entrada de bacterias. Los materiales de enmascaramiento que pueden usarse para este fin incluyen materiales poliméricos sintéticos y una piel cultivada. Sin embargo, los polímeros sintéticos pueden potencialmente provocar rechazo y similares y no se prefieren como injertos cutáneos. Por otro lado, la piel cultivada es una parte de la piel normal del propio paciente que se ha cultivado a un tamaño deseado, de modo que pueda usarse sin ninguna inconveniencia posible tal como rechazo y puede describirse bien como el material de enmascaramiento más natural.

25 El cultivo celular del tipo descrito anteriormente se ha realizado convencionalmente en la superficie de vidrio o las superficies de polímeros sintéticos sometidos a diversos tratamientos. Por ejemplo, una diversidad de recipientes y similares que están compuestos de poliestireno y que se han sometido a tratamientos superficiales tales como radiación con rayos gamma y recubrimiento de silicona se usan extensivamente como recipientes de cultivo celular. Las células que se han cultivado y han crecido en dichos recipientes de cultivo celular se desprenden y recuperan de la superficie del recipiente mediante tratamiento con enzimas proteolíticas tales como tripsina o agentes químicos.

30 Sin embargo, se ha indicado que existen varios defectos en la recuperación de células cultivadas por dicho tratamiento con agentes químicos; en primer lugar, el proceso de tratamiento es suficientemente complicado para aumentar la posibilidad de contaminación por impurezas; en segundo lugar, las células crecidas se desnaturalizan o dañan por el tratamiento químico y sus funciones inherentes se ven perjudicadas en algunos casos. Con la intención de superar estas dificultades, se han propuesto hasta el momento varias técnicas.

35 La Publicación de Patente Japonesa N° 23191-190 describe un método para producir membranas trasplantables de tejido queratinoso cultivando queratinocitos de un neonato humano en un recipiente de cultivo en condiciones en la que se forma una membrana de tejido queratinoso sobre la superficie del vaso y desprendiendo enzimáticamente la membrana de tejido queratinoso. Se describe específicamente la técnica en la que se cultivan células 3T3 como una capa de alimentación y se apilan en múltiples capas y la lámina celular resultante se recupera con una enzima proteolítica dispasa. Sin embargo, el método descrito en la patente ha tenido los siguientes defectos.

- 45 (1) La dispasa de origen bacteriano y la lámina celular recuperada debe lavarse exhaustivamente.  
 (2) Las condiciones de tratamiento con dispasa difieren de una célula cultivada a otra y el tratamiento requiere gran habilidad.  
 (3) Las células epidérmicas cultivadas se activan patológicamente por tratamiento con dispasa.  
 (4) El tratamiento con dispasa descompone la matriz extracelular.  
 (5) Como resultado, la parte enferma en la que se ha injertado la lámina celular recuperada es susceptible de infección.

50 La Patente Japonesa abierta a Inspección Pública N° 192138/1993 describe un método para cultivar células cutáneas preparando un soporte de cultivo celular que tiene una superficie de sustrato recubierta con un polímero cuya temperatura de solución crítica superior o inferior en el agua es de 0-80 °C, cultivando células cutáneas en el soporte de cultivo celular a una temperatura por debajo de la temperatura de solución crítica superior o por encima de la temperatura de solución crítica inferior y desprendiendo a continuación las células cutáneas cultivadas llevando la temperatura por encima de la temperatura de solución crítica superior o por debajo de la temperatura de solución crítica inferior. En este método, el cambio de temperatura se emplea para desprender las células del sustrato de cultivo recubierto con el polímero sensible a temperatura; sin embargo, el método no permite un desprendimiento de las células eficaz y la lámina celular obtenida tiene muchos defectos estructurales.

55 Shirakata *et al.*, 1999 describe una técnica para preparar un tejido tridimensional que comprende las etapas de primero preparar gel de colágeno neutralizado, dispersar fibroblastos dérmicos en el cultivo en gel y después sembrar queratinocitos en el gel después de cultivo de los fibroblastos dérmicos.

60 Yamato *et al.*, 1998 indica que se cultivaron células parenquimales hepáticas de rata cultivadas primarias en una

placa de cultivo sensible a temperatura y se enfriaron para obtener una lámina celular.

Kikuchi *et al.*, 1998 describe métodos para recuperar y transferir cultivos monocapa de células incluyendo membranas de quitina usadas como un soporte de células del extremo apical durante la transferencia de células cultivadas o inserto de cultivo celular usado como un soporte así como un nuevo sustrato que permite que las superficies basales de las células cultivadas se expongan al medio después de la transferencia.

Shirakata *et al.*, 1999 muestra láminas epidérmicas cultivadas obtenidas cultivando solamente queratinocitos en forma de lámina y piel cultivada tridimensional obtenida mediante el cultivo de fibroblastos en gel de colágeno seguido de cultivo de queratinocitos en el gel.

El documento WO 81/01416 describe una técnica en la que se construye una estructura tridimensional extracorporalmente usando tejido queratinoso vivo, que se desprende por proteasa.

**Descripción de la invención**

La presente invención se ha conseguido en un intento de resolver los problemas anteriormente mencionados de la técnica anterior. Por tanto, un objeto de la invención es proporcionar un proceso para producir una lámina cutánea cultivada multicapa que tenga sólo unos pocos defectos estructurales puesto que se recuperan con estructuras de desmosoma intracelulares y la proteína de membrana basal de célula a sustrato se mantiene intacta. Otro objeto de la invención es proporcionar un método caracterizado por cambiar la temperatura ambiental sin tratamiento con una enzima tal como dispasa y usando una membrana polimérica de modo que las células cultivadas y crecidas puedan desprenderse y recuperarse de la superficie de un soporte fácilmente y sin deformar su morfología.

Para conseguir estos objetos, los presentes inventores realizaron investigación y desarrollo realizando una revisión desde varios ángulos. Como resultado, han descubierto una técnica en la que cuando las células se cultivaron en un soporte de cultivo celular que tenía una superficie de sustrato recubierta con un polímero sensible a temperatura, permitiéndose opcionalmente a la capa de células cultivadas formar capas múltiples y la temperatura de la solución de cultivo se llevó a continuación por encima de una temperatura de solución crítica superior o por debajo de una temperatura de solución crítica inferior de modo que la lámina de células epidérmicas cultivadas o lámina cutánea multicapa estaría en contacto cercano con la membrana polimérica, desprendiéndose después la lámina junto con la membrana polimérica. Los inventores descubrieron que la lámina epidérmica o lámina cutánea multicapa obtenida de este modo tenía solamente unos pocos defectos estructurales. La presente invención se ha conseguido basándose en este hallazgo.

Por tanto, la presente invención proporciona un método para producir una lámina cutánea cultivada multicapa que sólo tiene unos pocos defectos estructurales puesto que se recuperan con estructuras de desmosoma intracelular y la proteína de membrana basal de célula a sustrato se mantiene intacta.

En particular, la presente invención proporciona un proceso para producir una lámina cutánea cultivada multicapa para su uso en injerto, que comprende cultivar células epidérmicas en un soporte de cultivo celular que tienen una superficie de sustrato recubierta con un polímero sensible a temperatura cuya temperatura de solución crítica superior o inferior en el agua es de 0-80 °C, para obtener una lámina celular cultivada multicapa de células epidérmicas, llevar la temperatura de la solución de cultivo por encima de temperatura de solución crítica superior o por debajo de la temperatura de solución crítica inferior, poner la lámina celular a contacto cercano con una membrana polimérica y desprender la lámina celular junto con una membrana polimérica,

En el que las células epidérmicas se cultivan en presencia de células 3T3 crecidas como una capa de alimentación formando de este modo la lámina de células cultivadas multicapa de células epidérmicas,

En el que la célula epidérmica es una seleccionada del grupo que consiste en queratinocitos y célula de membrana mucosa, en el que la membrana polimérica se selecciona del grupo que consiste en poliviniliden difluoruro (PVDF), celulosa y sus derivados y

En el que el desprendimiento de la lámina celular no implica tratamiento con una enzima proteolítica.

La invención también proporciona un proceso como se ha descrito anteriormente, que comprende adicionalmente permitir que la lámina celular en contacto cercano con la membrana polimérica se adhiera a otra lámina celular en un soporte de cultivo celular; añadiendo de este modo un medio para desprender la membrana polimérica de la lámina celular; y repitiendo estos procesos.

En una realización particular el polímero sensible a temperatura es poli(N-isopropilacrilamida).

En una realización adicional, la membrana polimérica es poliviniliden difluoruro hidrofiliado.

En una realización particular la otra lámina celular es al menos un miembro del grupo que consiste en una lámina

celular cultivada epidérmica, una lámina cutánea cultivada multicapa, así como una lámina de fibroblastos y una lámina celular endotelial vascular obtenible por el proceso como se ha definido anteriormente.

5 La invención también proporciona una lámina cutánea cultivada multicapa obtenible mediante el proceso que se ha descrito anteriormente, en particular una lámina cutánea cultivada multicapa que se adapta para su uso en el tratamiento de una quemadura y/o herida que se abren en profundidad en un tejido cutáneo.

10 La presente invención también proporciona el uso de una lámina cutánea cultivada multicapa como se ha definido anteriormente en la preparación de un injerto para una quemadura y/o una herida que se abre en profundidad en un tejido cutáneo, por tanto la invención también proporciona la lámina cutánea cultivada multicapa como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento en una quemadura y/o herida que se abre en profundidad en un tejido cutáneo.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1 es un conjunto de microfotografías que muestran como las láminas cutáneas cultivadas se apilan en diversas condiciones; las imágenes en la fila superior son microfotografías de células que se cultivaron en una placa de cultivo habitual en la que no se injertó polímero sensible a temperatura y las imágenes en la fila inferior son microfotografías de células que se cultivaron en una placa de cultivo a la que se injertó poliisopropil acrilamida (PIPAAm).

20 La Fig. 2 es un conjunto de microfotografías de células que se cultivaron en una placa de cultivo en la que se injertó poliisopropil acrilamida (PIPAAm); la fila superior muestra microfotografías de células cultivadas que se tiñeron con HE después de tratamiento con dispasa a los 21 días de cultivo.

25 La Fig. 3 es una imagen electroforética que muestra los resultados de recuperar la lámina cutánea cultivada multicapa en una placa de cultivo sensible a temperatura por tratamiento con baja temperatura (incubado a 20 °C durante 30 minutos) o tratamiento con dispasa o estimulación física (raspando con una espátula) y cuantificar el contenido de proteína total de las células por electroforesis.

30 La Fig. 4 es una imagen electroforética que muestra los resultados de recuperar las múltiples capas celulares epidérmicas en una placa de cultivo sensible a temperatura por tratamiento con baja temperatura (incubando a 20 °C durante 30 minutos) o tratamiento de dispasa o estimulación física (raspando con una espátula) y analizar las capas celulares recuperadas por transferencia de Western con un anticuerpo anti-cadherina E o un anticuerpo anti-laminina 5.

35 La Fig. 5 es una microfotografía de una sección tisular que muestra el resultado de injertar en un ratón desnudo la lámina cutánea cultivada multicapa de la invención como se obtuvo por tratamiento con temperatura baja.

La Fig. 6 es un conjunto de microfotografías que muestran el resultado de tinción con azán de secciones tisulares obtenidas mediante el injerto en ratas desnudas de una lámina cutánea cultivada multicapa preparada por tratamiento con temperatura baja y una lámina cultivada multicapa preparada por tratamiento con dispasa.

40 La Fig. 7 es un conjunto de microfotografías que muestran el resultado de revestimiento con plata de secciones tisulares obtenidas mediante injerto en ratas desnudas de una lámina cutánea cultivada multicapa preparada por tratamiento con baja temperatura y una lámina cutánea cultivada multicapa preparada por tratamiento con dispasa.

45 **Mejor modo de llevar a cabo la invención**

Pueden mencionarse las células epidérmicas como células para su uso en la preparación de la lámina cutánea cultivada multicapa de la invención. Las células epidérmicas son queratinocitos y células membranosas mucosas, son deseables queratinocitos humanos. En la presente invención, la lámina celular cultivada epidérmica significa una lámina que, como se ha descrito anteriormente, se obtiene mediante cultivo primero en un soporte de cultivo de una monocapa de diversas células que forman la epidermis del cuerpo vivo y desprendiendo después la monocapa del soporte; la lámina cutánea cultivada multicapa significa una lámina que comprende múltiples de tales láminas celulares cultivadas epidérmicas, tomadas individualmente o en combinación.

55 La lámina cutánea cultivada multicapa en la presente invención es tal que no se dañaban por enzimas proteolíticas tipificadas por dispasa y tripsina durante el cultivo. Por lo tanto, la lámina cutánea cultivada multicapa cuando se desprende del sustrato mantiene las estructuras de desmosoma intercelulares intactas, teniendo sólo unos pocos defectos estructurales y presentando gran fuerza. Una ventaja de esta característica es que cuando la lámina cutánea obtenida se emplea para fines médicos tales como el injerto de piel, la parte enferma se aísla completamente del exterior por las láminas de la invención y se hace menos susceptible a la infección. Las láminas de la invención también se caracterizan porque la proteína de célula a sustrato que se asemeja a la lámina basal que se formó durante el cultivo no se ha destruido enzimáticamente. Esto ayuda a asegurar la adhesión eficaz de la lámina al tejido de la parte enferma tras el injerto y puede implementarse tratamiento eficaz. Descrito específicamente, si se usa una enzima proteolítica habitual tal como tripsina, las estructuras de desmosoma intercelulares y la proteína de célula a sustrato que se asemeja a la lámina basal se mantienen intactas en pocas ocasiones y, por lo tanto, las células se separan individualmente a medida que se desprenden del sustrato. Entre las

enzimas proteolíticas aplicables, se sabe que la dispasa que destruye prácticamente toda la proteína de célula a sustrato que se asemeja a la lámina basal es capaz de permitir que las células se desprendan del sustrato manteniendo 10-60 % de las estructuras de desmosoma intactas. Sin embargo, la lámina celular obtenida sólo tiene una fuerza débil. Por el contrario, ambas estructuras de desmosoma y proteína de membrana basal permanecen cada una en al menos 80 % en la lámina celular de la invención y pueden obtenerse las diversas ventajas anteriormente descritas.

Como se ha descrito anteriormente, la lámina cutánea cultivada multicapa de la invención conserva ambas estructuras de desmosoma intercelular y proteína de membrana basal de célula a sustrato y aún muestra alta fuerza; tales láminas nunca se han podido obtener por la técnica anterior.

El polímero sensible a temperatura usado para recubrir el sustrato del soporte de cultivo celular tiene una temperatura de solución crítica superior o inferior en solución acuosa que está generalmente en el intervalo de 0 °C - 80 °C, preferiblemente 20 °C - 50 °C. Si la temperatura de solución crítica superior o inferior excede 80 °C, las células pueden potencialmente morir y esto no es preferible. Si la temperatura de solución crítica superior o inferior es menor de 0 °C, la tasa de crecimiento celular habitualmente descenderá en un grado extremo o las células morirán, lo que tampoco es preferible.

El polímero sensible a temperatura a usar en la invención puede ser un homopolímero o un copolímero. Se describen polímeros ejemplares en la Patente Japonesa abierta a Inspección Pública N° 211865/1990. Específicamente, se obtienen por homo o co-polimerización de los siguientes monómeros. Los monómeros útiles incluyen, por ejemplo, compuestos de (met)acrilamida, derivados de (met)acrilamida sustituidos con N-(o N,N-di)alquilo y derivados de vinil éter; en el caso de copolímeros, pueden emplearse dos cualesquiera o más de estos monómeros. Además, estos monómeros pueden copolimerizarse con otros monómeros o un polímero puede injertarse en otro o dos polímeros pueden copolimerizarse o puede emplearse una mezcla de polímero y copolímero. Si se desea, los polímeros pueden reticularse en un grado que no perjudicará a sus propiedades inherentes.

El sustrato que debe proporcionarse con recubrimientos puede ser de cualquier tipo incluyendo los que se usan habitualmente en el cultivo celular, como se ejemplifica por vidrio, vidrio modificado y compuestos tales como poliestireno y poli(metilmetakrilato), así como sustancias a las que generalmente puede darse forma, por ejemplo compuestos poliméricos distintos de los anteriormente enumerados y cerámicas.

El método de recubrir el soporte con el polímero sensible a temperatura no está limitado de ningún modo particular y puede estar de acuerdo con la descripción de la Patente Japonesa abierta a Inspección Pública N° 211865/1990. Específicamente, dicho recubrimiento puede realizarse sometiendo el sustrato y el monómero o polímero anteriormente mencionado a uno de exposición a haz de electrones (EB), irradiación con rayos gamma, irradiación con rayos UV, tratamiento con plasma, tratamiento de corona y reacción de polimerización orgánica o pueden adoptarse otras técnicas tales como absorción física como se consigue por aplicación de recubrimiento y amasado.

En la presente invención, el cultivo celular se realiza en el soporte de cultivo celular (por ejemplo placa de cultivo celular) que se ha preparado como se ha descrito anteriormente. La temperatura del medio no está limitada a ningún valor particular; si el polímero anteriormente mencionado que forma la cubierta en la superficie de sustrato tiene una temperatura de solución crítica superior, la temperatura del medio puede ser inferior que dicha temperatura de solución crítica superior; si dicho polímero tiene una temperatura de solución crítica inferior, la temperatura del medio puede ser mayor que dicha temperatura de solución crítica inferior. Por supuesto, el cultivo es inapropiado si es en un intervalo de temperatura baja en el que las células cultivadas no crecen o en un intervalo de temperatura alta en el que las células cultivadas mueren. Pueden adoptarse condiciones de cultivo distintas de temperatura en las técnicas convencionales y no están limitadas de ningún modo particular. Por ejemplo, el medio a usar puede ser uno que esté complementado con sueros tales como suero de ternero fetal (PCS); como alternativa, puede ser un medio sin suero o uno que no esté complementado con ningún suero.

En el método de la invención, el tiempo de cultivo puede ajustarse de acuerdo con el procedimiento anteriormente mencionado a un valor que se ajuste al objeto específico de usar la lámina cutánea multicapa. Para desprender y recuperar las células cultivadas del material de soporte, la lámina cutánea multicapa cultivada se pone en contacto cercano con la membrana polimérica y la temperatura del material de soporte en contacto cercano con las células se lleva por encima de la temperatura de solución crítica superior del polímero con el que el sustrato de soporte se recubre o por debajo de su temperatura de solución crítica inferior, por lo que cualquier lámina puede desprenderse del sustrato junto con la membrana polimérica. Desprender las láminas puede realizarse no solamente en la solución de cultivo usada para cultivar las células sino también en otras soluciones isotónicas; puede seleccionarse una solución adecuada de acuerdo con un objeto específico. Los ejemplos de la membrana polimérica que pueden usarse para conseguir contacto cercano con la lámina celular epidérmica o la lámina cutánea multicapa incluyen polivinilideno difluoruro (PVDF) y celulosa y sus derivados.

El método para producir la lámina cutánea cultivada multicapa de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitado. Los ejemplos incluyen un método en el que las células epidérmicas se dejan crecer en presencia de células 3T3 generalmente conocidas como una capa de alimentación y de este modo una lámina

celular cultivada epidérmica se apila en múltiples capas y un método para usar la lámina celular cultivada epidérmica en contacto cercano con la membrana polimérica anteriormente mencionada. También puede describirse los siguientes métodos.

- 5 (1) Se permite que la lámina celular en contacto íntimo con la membrana polimérica se adhiera al soporte de cultivo celular y de este modo se añade un medio para desprender la membrana polimérica de la lámina celular; después, se permite que una lámina celular en contacto íntimo con otra membrana polimérica se adhiera a la primera membrana celular; este proceso se repite para formar múltiples láminas celulares.
- 10 (2) La membrana celular en contacto íntimo con la membrana polimérica se vuelve y se fija al soporte de cultivo celular de modo que la membrana polimérica entra en contacto con el soporte; se permite que otra lámina celular se adhiera a la primera lámina celular; a continuación, se añade un medio para desprender la membrana polimérica de una segunda lámina celular, a la que se ha permitido que se adhiera otra membrana celular más; este proceso se repite para formar múltiples membranas celulares.
- 15 (3) Dos membranas celulares cada una en contacto íntimo con la membrana polimérica se ponen en sí mismas en contacto íntimo entre sí.
- (4) La membrana celular en contacto íntimo con la membrana polimérica se aplica a la parte enferma del cuerpo vivo y se permite que se adhiera a un tejido vivo; después, la membrana polimérica se desprende y se superpone otra lámina celular en la primera lámina celular.

20 La lámina cutánea cultivada multicapa de la invención no está compuesta necesariamente de queratinocitos solamente. Por ejemplo, una lámina celular o lámina cutánea multicapa que está compuesta de queratinocitos puede superponerse con una lámina de fibroblastos y/o lámina celular angioendotelial que se ha preparado por operaciones similares. Esta técnica es extremadamente eficaz para realizar un producto aún más cerca de un tejido cutáneo *in vivo*.

25 Para desprender y recuperar la célula cutánea cultivada multicapa con alta eficacia, puede emplearse golpear ligeramente el soporte de cultivo celular o moverlo suavemente, agitar el medio con una pipeta y otros métodos solos o en combinación. Además, las células cultivadas pueden opcionalmente lavarse con una solución isotónica y similares para desprenderse y recuperarse.

30 La lámina cutánea cultivada multicapa que se obtiene por el método descrito anteriormente es muy superior a las obtenidas por los métodos de la técnica anterior con respecto a tanto facilidad de desprendimiento como no invasividad y es muy prometedora en aplicaciones clínicas tales como injerto de piel. En particular, la lámina cutánea cultivada multicapa de la invención es distinta de las láminas cutáneas cultivadas convencionales por que mantiene la proteína de membrana basal intacta; por lo tanto, cuando se usa como un injerto cutáneo, se adherirá de forma viable al tejido de la parte enferma incluso si se corta en profundidad. Esto significa una mejora de la eficacia del tratamiento de la parte enferma e incluso una menor tensión para el paciente; las láminas de la invención resultarán por lo tanto ser una tecnología muy eficaz. Además, el método de cultivo celular de la invención es una tecnología eficaz no solamente para queratinocitos sino también para células renales, células de pulmón, membranas mucosas

35 o células epiteliales en diversos órganos del sistema alimentario. Obsérvese que el soporte de cultivo celular a usar en el método de la invención puede usarse una y otra vez.

### Ejemplos

45 En las páginas siguientes, la presente invención se describe en más detalle con referencia a ejemplos, que no se pretende de ningún modo que limiten la invención.

#### **Ejemplo 1: Desprendimiento y recuperación de láminas de queratinocitos humanos cultivadas y apiladas en placa de cultivo sensible a temperatura:**

##### 50 Materiales

Se usaron los siguientes materiales.

- 55
- Células: queratinocitos de neonatos humanos (Sanko Junyaku Co., Ltd. CC-2503), células NIH3T3
  - Placa de cultivo: placa de cultivo sensible a temperatura H003 (1,9 µg/cm<sup>2</sup>), Falcon 3001 como un control
  - Medio: DMEM + AB (para preparar una capa de alimentación), medio de Greene *et al.* (para queratinocitos de neonatos humanos)
  - Mitomicina C (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

60

  - Dispasa (GODO SHUSEI CO., LTD.)
  - Membrana Durapore (membrana de PVDF hidrofílica, modelo N° SULP04700, producto de MILLIPORE)

##### Método

65 Se sembraron células NIH3T3 en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro (3001, H003) a una densidad de 2 ×

$10^4$  células/cm<sup>2</sup>; después de que las células se adhirieron y expandieron, el medio se reemplazó por un medio sin suero que contenía mitomicina C 16 µg/ml; después de un tratamiento de 2 horas, los queratinocitos de neonatos humanos se sembraron en una placa a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/placa.

- 5 Tres semanas después, las células en H003 se desprendieron por tratamiento con Dispasa 30 unidades/cm<sup>2</sup> (GODO SHUSEI CO., LTD.) o tratamiento a baja temperatura de acuerdo con el siguiente procedimiento. Las células en Falcon 3001 se desprendieron por tratamiento con Dispasa 30 unidades/cm<sup>2</sup> (GODO SUSHEI CO., LTD.)

[Tratamiento de dispasa]

- 10 Después de aspirar el medio, se colocó membrana Durapore cortada al tamaño de placa de cultivo de 35 mm de diámetro en la capa celular y se añadió Dispasa en partes de 1 ml. Después de permanecer a temperatura ambiente durante 30 minutos, el medio se aspiró y la lámina celular se desprendió junto con la membrana.

- 15 [Tratamiento de baja temperatura]

Después de aspirar el medio, se colocó membrana Durapore cortada al tamaño de placa de cultivo de 35 mm de diámetro en la capa celular y se realizó incubación a 20 °C durante 30 minutos. A continuación, la lámina celular se desprendió mediante fórceps de modo que descansara sobre la membrana.

- 20 [Secciones tisulares]

- 25 La membrana que portaba las células desprendidas se transfirió a una placa de cultivo y se fijó con paraformaldehído 4 %. Para la deshidratación, se repitió el siguiente procedimiento tres veces: i) mantener en etanol 70 %, 80 % y 90 % cada uno durante 10 minutos; ii) mantener al 100 % durante aproximadamente 1 hora; iii) mantener en cloroformo durante 30 minutos para reemplazar el alcohol por cloroformo. La parafina que se había fundido a 61 °C se moldeó en la placa de cultivo y se incubó a 61 °C hasta que rodeada completamente la muestra; después se permitió que la parafina solidificara a temperatura ambiente. La parafina solidificada se cortó en secciones delgadas, que se tiñeron con HE y se examinaron en el microscopio.

- 30 Resultados

Los resultados se muestran en las Figs. 1 - 7.

- 35 La Fig. 1 es un conjunto de microfotografías que muestran cómo las láminas celulares cultivadas se apilaron en diversas condiciones. En la Fig. 1, "PSt no injertado" se refiere al caso de cultivo en una placa de poliestireno de cultivo celular no recubierta con el polímero sensible a temperatura; "injertado con PIPAAm" se refiere al caso de cultivo en una placa de cultivo en la que se ha injertado acrilamida de poliisopropilo (PIPAAm); "cultivado 21-d" significa cultivo durante 21 días; "dispasa" significa tratamiento con Dispasa; "Temp. reducida" significa tratamiento con temperatura baja; "escala= 100 µm" significa que la barra (blanca o negra) de cada una de las Figs. 1a - 1j tiene una longitud de 100 µm.

- 45 Las imágenes a - e en la fila superior son microfotografías de células que se cultivaron en una placa ordinaria en la que no se injertó polímero sensible a temperatura. El aumento de cada imagen se indica por la longitud de la barra; las imágenes a y b muestran el crecimiento de células cultivadas durante 21 días, siendo la imagen a una microfotografía tomada a aumento bajo y la imagen b aumento alta; la imagen c muestra células cultivadas que se trataron con Dispasa después de 21 días de cultivo; las imágenes d y e muestran células incubadas a 20 °C durante 30 minutos después de 21 días de cultivo, habiéndose tomado la imagen d a bajo aumento y la imagen e a alto aumento. Las imágenes f - j en la fila inferior son microfotografías de células que se cultivaron en una placa de cultivo en la que se injertó acrilamida de poliisopropilo (PIPAAm); las imágenes f y g muestran el crecimiento de células cultivadas durante 21 días, habiéndose tomado la imagen f a bajo aumento y la imagen g a alto aumento; la imagen h muestra células cultivadas que se trataron con Dispasa después de 21 días de cultivo; las imágenes i y j muestran células incubadas a 20 °C durante 30 minutos después de 21 días de cultivo, habiéndose tomado la imagen i a bajo aumento y la imagen j a alto aumento.

- 55 Los resultados mostrados en la Fig. 1 revelaron lo siguiente: la placa de cultivo en la que se había injertado poliisopropil acrilamida (véanse las imágenes en la fila inferior) permite un cultivo celular tan eficaz como en la placa de cultivo habitual (véanse las imágenes en la fila superior) y, lo que es más, las células cultivadas pueden desprenderse en forma de una lámina solamente reduciendo la temperatura. No puede recuperarse lámina celular de la placa de cultivo habitual.

- 60 La Fig. 2 es un conjunto de microfotografías de células que se cultivaron en una placa de cultivo en la que se había injertado poliisopropil acrilamida (PIPAAm). En la Fig. 2, "dispasa" significa tratamiento con dispasa y "Temp. baja" significa tratamiento con temperatura baja.

- 65 Las imágenes en la fila superior de la Fig. 2 son microfotografías que muestran el resultado de tinción HE de células

que se trataron con dispasa después de 21 días de cultivo. Las imágenes de la fila inferior son microfotografías que muestran el resultado de tinción con HE de células que se incubaron a 20 °C durante 30 minutos después de 21 días de cultivo. Las partes teñidas aparecen sólidas en las imágenes; "dispasa" significa tratamiento con dispasa y "Temp. reducida" significa tratamiento con temperatura baja.

Los resultados mostrados en la Fig. 2 revelaron lo siguiente: en las láminas celulares obtenidas por tratamiento con temperatura baja (véanse las imágenes en la fila inferior), la proteína intercelular estaba teñida (como se indica por las partes sólidas); en las láminas celulares obtenidas por tratamiento con dispasa (véanse las imágenes en la fila superior), no había partes intercelulares teñidas (sin partes sólidas), lo que indica que la proteína intercelular había desaparecido de las láminas cutáneas cultivadas.

La Fig. 3 es una imagen electroforética que muestra los resultados de recuperar las capas celulares epidérmicas apiladas del Ejemplo 1 en una placa de cultivo sensible a temperatura por tratamiento con temperatura baja (que incubaba a 20 °C durante 30 minutos) o tratamiento con dispasa o estimulación física (raspar con una espátula) y cuantificar el contenido de proteína total de las células por electroforesis. En la Fig. 3, 66 K se refiere a albúmina de suero, 116 K se refiere a  $\beta$ -galactosidasa, 200 K se refiere a miosina, PSt se refiere a placa de poliestireno de cultivo celular no recubierta con un polímero sensible a temperatura, PIPAAm se refiere a una placa de poliestireno recubierta con poliisopropil acrilamida, D se refiere a una capa celular recuperada por tratamiento con dispasa, S se refiere a una capa celular recuperada por estimulación física y T se refiere a una capa celular recuperada por tratamiento con temperatura baja. Los resultados muestran que los tipos de proteínas que estaban presentes en las células y sus cantidades no cambiaron entre los dos tipos de placa de cultivo o entre los tres métodos de desprender la lámina celular.

La Fig. 4 es una imagen electroforética que muestra los resultados de recuperar las capas celulares epidérmicas apiladas del Ejemplo 1 en una placa de cultivo sensible a temperatura por tratamiento con temperatura baja (incubar a 20 °C durante 30 minutos), o tratamiento con dispasa o estimulación física (raspar con una espátula) y analizar las capas celulares recuperadas por transferencia de western con un anticuerpo anti-cadherina E o un anticuerpo anti-laminina 5 (indicado como laminina 5( $\gamma$ 2)). En la Fig. 4, PSt, PIPAAm, D, S y T tienen los mismos significados que se definen para la Fig. 3. El panel marcado con cadherina E muestra el resultado de usar un anticuerpo anti-cadherina E y el panel marcado laminina 5( $\gamma$ 2) muestra el resultado de usar un anticuerpo anti-laminina 5. En la Fig. 4, 120 K se refiere a cadherina E que se sabe que existe entre células y 150 K y 105 K se refieren a laminina 5 (laminina 5( $\gamma$ 2)) que se sabe que existe entre una célula y el sustrato. Los resultados revelaron lo siguiente.

(1) Placa de cultivo ordinaria (hecha de poliestireno)

En D (tratamiento de dispasa), se produjo pérdida de proteínas. En S (raspar con una espátula), la proteína se mantuvo intacta pero las células, desprendiéndose forzosamente del sustrato, proporcionaron una lámina celular que tenía muchos defectos estructurales.

(2) Placa de cultivo en la que se injertó poliisopropil acrilamida

En D (tratamiento con dispasa), se produjo pérdida de proteínas. En S (raspar con una espátula), la proteína se mantuvo intacta pero las células, que se desprendieron forzosamente del sustrato, proporcionaron una lámina celular que tenía muchos defectos estructurales. En T (tratamiento con temperatura baja, el método de la invención), se obtuvo una lámina celular que no solamente mantenía la proteína intacta sino que también tenía muy pocos defectos estructurales.

La Fig. 5 es una microfotografía que muestra el resultado de injertar en una rata desnuda (F344nu/nu (rata sin timo), macho, 4 semanas de edad) la lámina cutánea cultivada multicapa de la invención como se obtuvo por tratamiento de baja temperatura en el Ejemplo 1. En la Fig. 5, la lámina cutánea cultivada multicapa se indica por b y el tejido de rata por c; como se indica por a, la lámina cutánea injertada se adhirió de forma viable para formar una capa queratinizada.

Resulta evidente a partir de la Fig. 5 que las múltiples capas injertadas de láminas cutáneas cultivadas de la invención de adherían de forma viable al tejido de rata de una manera satisfactoria (el límite entre b y c, no se hinchó, ni se desprendió la lámina cutánea injertada del tejido de rata).

Las Figs. 6 y 7 muestran los resultados de tinción con azán y recubrimiento con plata, respectivamente, de las secciones tisulares mostradas en la Fig. 5. En las Figs. 6 y 7, las múltiples capas injertadas de lámina cutánea cultivada se indican por a y el tejido de rata por c. Las capas múltiples de lámina cutánea cultivada como se obtienen por tratamiento con temperatura baja se adherieron de forma viable al tejido de rata de una manera satisfactoria. Por otro lado, en las capas múltiples de lámina cutánea cultivada como se obtuvieron por tratamiento con dispasa, la capa de lámina basal entre a y c se interrumpió por dispasa (como se indica por d) y se formaron cavidades vacías entre a y c (como se indica por b). Resultó por lo tanto evidente que la lámina cutánea injertada tenía la lámina basal interrumpida y, por lo tanto, no podía adherirse de forma viable al tejido vivo de una manera satisfactoria.



**Ejemplo 2**

Se sembraron en placas fibroblastos humanos ( $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>; KURABO INDUSTRIES, LTD.) en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro en la que se había injertado poliisopropil amida (PIPAAm) en una cantidad de 1,9 µg/cm<sup>2</sup> y las células se cultivaron de la manera habitual (en suero bovino al 20 % que contenía DMEM). Cinco días después, tras de confirmar la confluencia de los fibroblastos humanos, el medio se aspiró. Inmediatamente después, las capas múltiples de lámina cutánea cultivada en contacto íntimo con la membrana polimérica como se obtuvo en el Ejemplo 1 de la placa de cultivo injertada con PIPPAm por tratamiento con temperatura baja se colocó sobre la lámina de fibroblastos humanos; a continuación, se vertió un medio del mismo tipo que el usado en el Ejemplo 1 suavemente y se desprendió la membrana polimérica. Por cultivo de 2 días posterior, la lámina de fibroblastos se adhirió a las capas múltiples de lámina cutánea cultivada. La lámina cutánea cultivada multicapa que portaba ahora la lámina de fibroblastos se desprendió de la superficie del soporte realizando el mismo tratamiento de baja temperatura que en el Ejemplo 1. La lámina cutánea cultivada multicapa se injertó en una rata desnuda como en el Ejemplo 1 y se comparó con la lámina cutánea cultivada multicapa del Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Lámina cutánea	Fuerza de la lámina	Posibilidad de injerto	
		Velocidad de adherencia	Viabilidad
Lámina cutánea del Ejemplo 1	○	○	○
Lámina cutánea del Ejemplo 2	○	⊙	○

(Nota) ⊙, excelente ○, bueno

Los resultados anteriores muestran que la lámina cutánea cultivada multicapa obtenida en el Ejemplo 2 también se adhería de forma viable al tejido de rata de una manera satisfactoria. Además, esta lámina tenía la ventaja de reducir el tiempo requerido para conseguir adherencia viable.

En los Ejemplos 1 y 2, se realizó “tratamiento de temperatura baja” por incubación a 20 °C durante 30 minutos pero estas condiciones de temperatura y tiempo no son las únicas condiciones para realizar el “tratamiento de baja temperatura” de la invención. La condición de temperatura preferida para el “tratamiento de baja temperatura” es de 0 - 30 °C y la condición de tiempo preferida varía de 2 minutos a 1 hora.

**Ejemplo 3**

Se trató a un paciente con una quemadura en la cara pero permaneció una cicatriz. Con el consentimiento del paciente, se aplicó la lámina cutánea cultivada multicapa de la invención para tratar la cicatriz. Específicamente, se tomó una muestra de membrana celular epidérmica de tamaño 1 cm x 1 cm del brazo del paciente y se disgregó en células individuales por tripsinización de la manera habitual. Las células se cultivaron después de acuerdo con el Ejemplo 1 tanto en una placa de cultivo (H003) recubierta con poliisopropil acrilamida como en una placa de cultivo ordinaria (control, Falcon 3001). Tres semanas después, la lámina cutánea cultivada multicapa en el sustrato H003 se desprendió por tratamiento con temperatura baja mientras que la lámina cutánea del sustrato de control se desprendió por tratamiento con dispasa.

La cicatriz en la cara del paciente se cortó de forma general a la profundidad habitual pero se cortó a una mayor profundidad en áreas seleccionadas. De este modo, la herida se cortó en dos profundidades diferentes, en las que se injertaron cada una de las láminas cutáneas. Después de una semana de mantenimiento, se observó la viabilidad de las láminas que se adherían a la herida. El resultado se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

	Profundidad de la herida	
	Superficial	Profunda
Viabilidad de la lámina cutánea obtenida por tratamiento con baja temperatura	⊙	○
Viabilidad de la lámina cutánea obtenida por tratamiento con dispasa	○	X

(Nota) ⊙, excelente; ○, buena; X, baja

A partir de los resultados anteriores, puede verse que la lámina cutánea de la invención podría adherirse de forma viable de una manera satisfactoria a una herida que se cortó a una gran profundidad que habría evitado la adhesión viable de la lámina cutánea cultivada multicapa que se recuperó por tratamiento con dispasa. Esto consigue dos ventajas principales: en primer lugar, el tratamiento es eficaz y reduce el estrés sobre el paciente; en segundo lugar, la cicatriz se corta con profundidad suficiente para asegurar que la lámina cutánea injertada proporciona mejor atractivo estético. Por lo tanto, la lámina cutánea cultivada multicapa de la invención constituirá una tecnología muy eficaz.

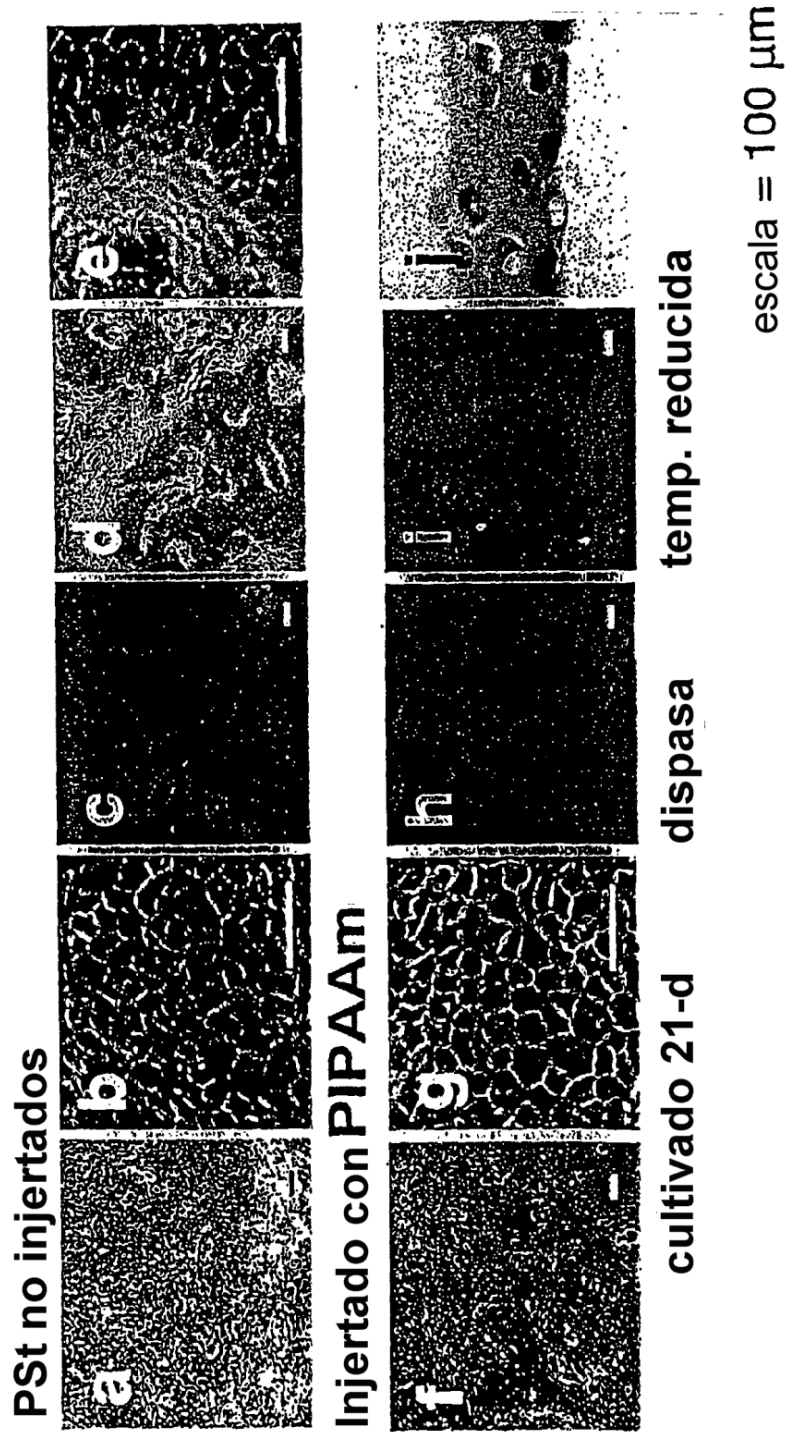
**Aplicabilidad industrial**

5 La lámina cutánea cultivada multicapa de la invención no degrada cadherina E o laminina 5 como se contrasta con tratamiento con dispasa y aún implican muy pocos defectos estructurales; estas láminas son por lo tanto muy prometedoras en aplicaciones clínicas tales como injerto cutáneo. Por lo tanto, la presente invención es extremadamente útil en los campos médicos y biológicos, particularmente en la ingeniería celular y la ingeniería médica.

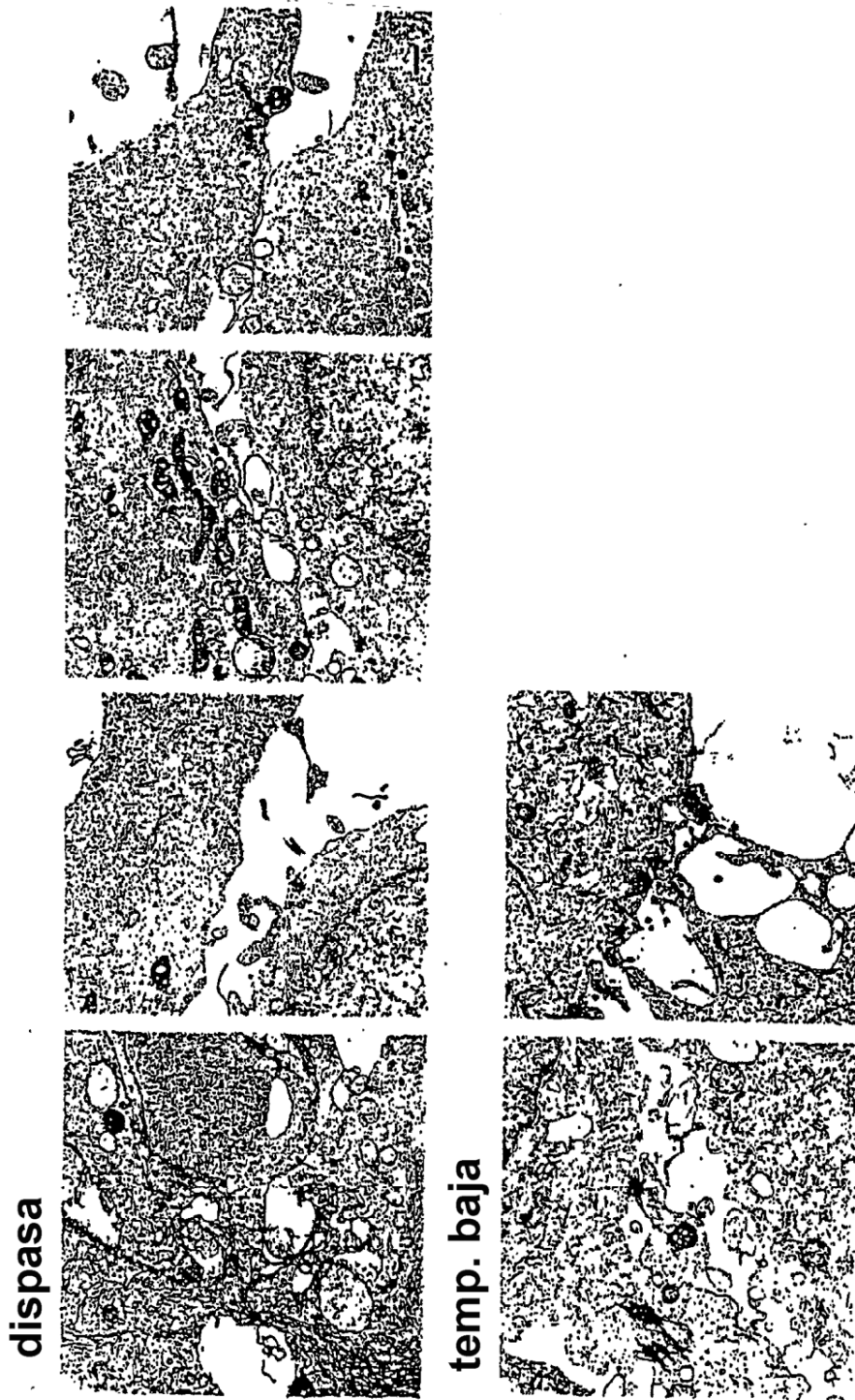
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un proceso para producir una lámina cutánea cultivada multicapa para su uso en injertos, que comprende cultivar células epidérmicas en un soporte de cultivo celular que tiene una superficie de sustrato recubierta con un polímero sensible a temperatura cuya temperatura de solución crítica superior o inferior en agua es 0-80 °C, para obtener una lámina celular cultivada multicapa de células epidérmicas, llevar la temperatura de la solución de cultivo por encima de la temperatura de solución crítica superior o por debajo de la temperatura de solución crítica inferior, poner la lámina celular en contacto cercano con una membrana polimérica y desprender la lámina celular junto con una membrana polimérica,
- 10 en el que las células epidérmicas se cultivan en presencia de células 3T3 crecidas como una capa de alimentación que forman de este modo la lámina celular cultivada multicapa de células epidérmicas, en el que la célula epidérmica es una seleccionada del grupo que consiste en queratinocitos y célula de membrana mucosa,
- 15 en el que la membrana polimérica se selecciona del grupo que consiste en poliviniliden difluoruro (PVDF), celulosa y sus derivados y en el que el desprendimiento de la lámina celular no implica tratamiento con una enzima proteolítica.
2. El proceso para producir una lámina cutánea cultivada multicapa de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente permitir que la lámina celular en contacto cercano con la membrana polimérica se adhiera a otra lámina celular en un soporte de cultivo celular; añadir a continuación un medio para desprender la membrana polimérica de la lámina celular; y repetir estos procesos.
- 20 3. El proceso para producir una lámina cutánea cultivada multicapa de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el polímero sensible a temperatura es poli(N-isopropilacrilamida).
- 25 4. El proceso para producir una lámina cutánea cultivada multicapa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la membrana polimérica es poliviniliden difluoruro hidrofiliado.
- 30 5. El proceso para producir una lámina cutánea cultivada multicapa de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la otra lámina celular es al menos un miembro del grupo que consiste en una lámina celular cultivada epidérmica, una lámina cutánea cultivada multicapa, así como una lámina de fibroblastos y una lámina celular endotelial vascular que se puede obtener por el proceso de acuerdo con la reivindicación 1.
- 35 6. Una lámina cutánea cultivada multicapa que se puede obtener por el proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. La lámina cutánea cultivada multicapa de acuerdo con la reivindicación 6, que se adapta para su uso en el tratamiento de una quemadura y/o una herida que se cortan en profundidad en un tejido cutáneo.
- 40 8. Uso de la lámina cutánea cultivada multicapa de acuerdo con la reivindicación 6 en la preparación de un injerto para una quemadura y/o una herida que se corta en profundidad en un tejido cutáneo.
- 45 9. La lámina cutánea cultivada multicapa de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de una quemadura y/o una herida que se corta en profundidad en un tejido cutáneo.

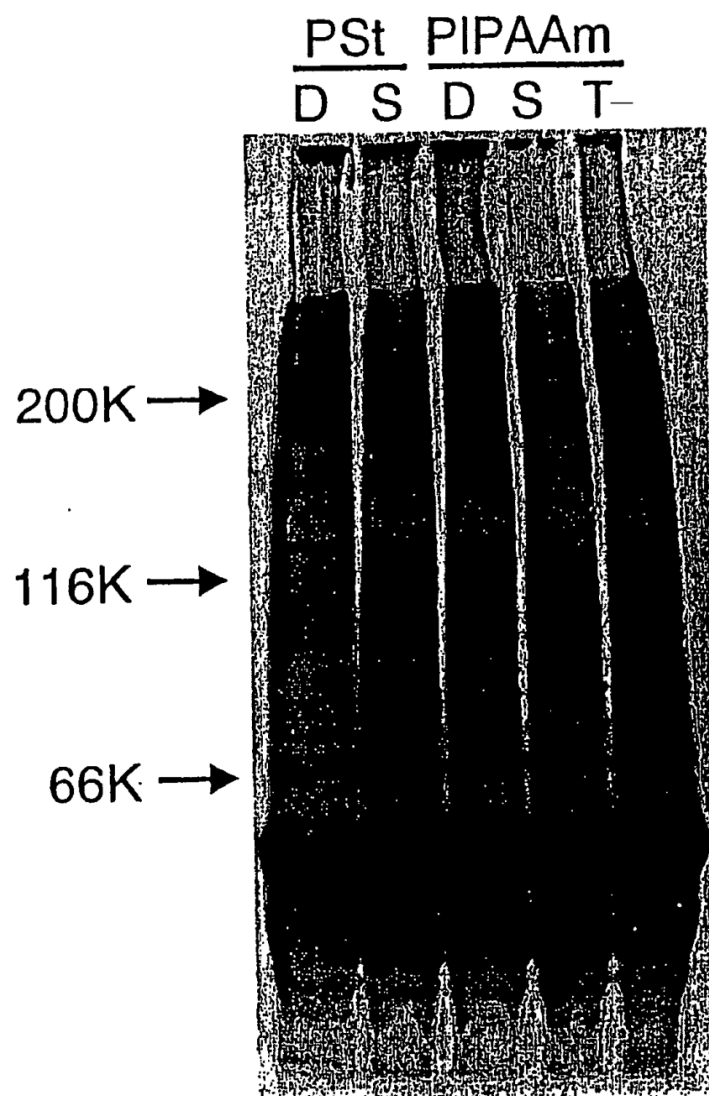
*Fig. 1*



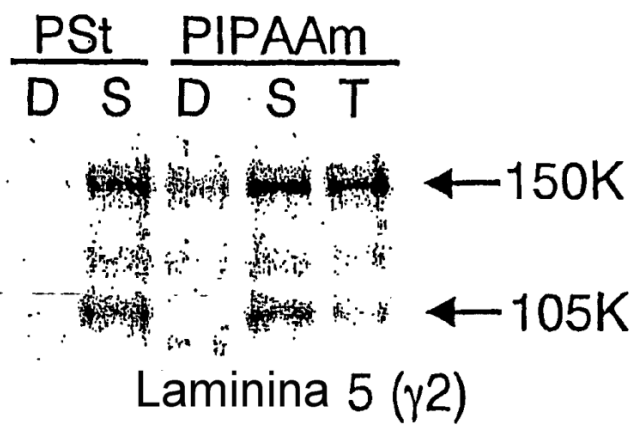
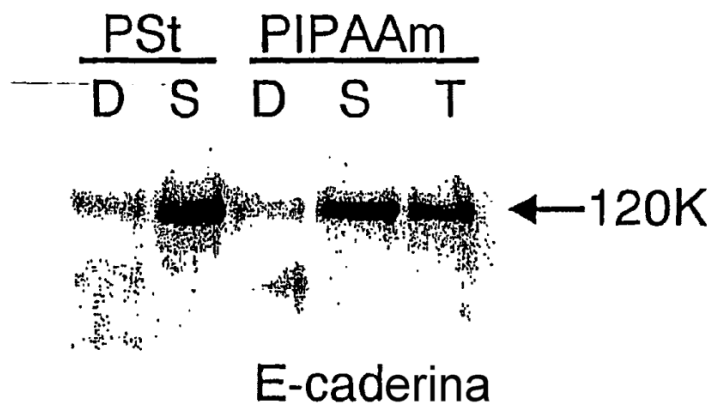
*Fig. 2*



*Fig. 3*



*Fig. 4*

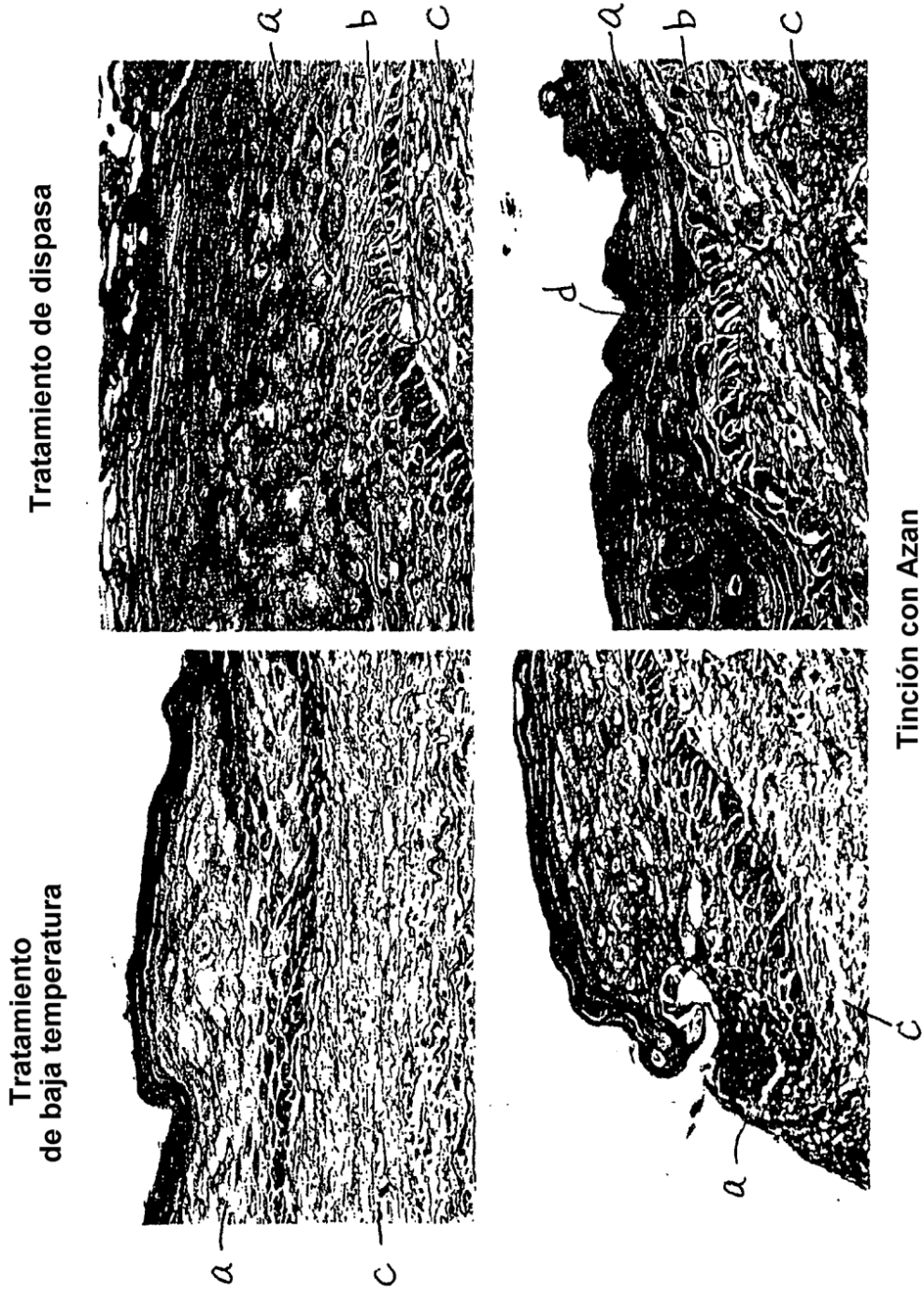


*Fig. 5*

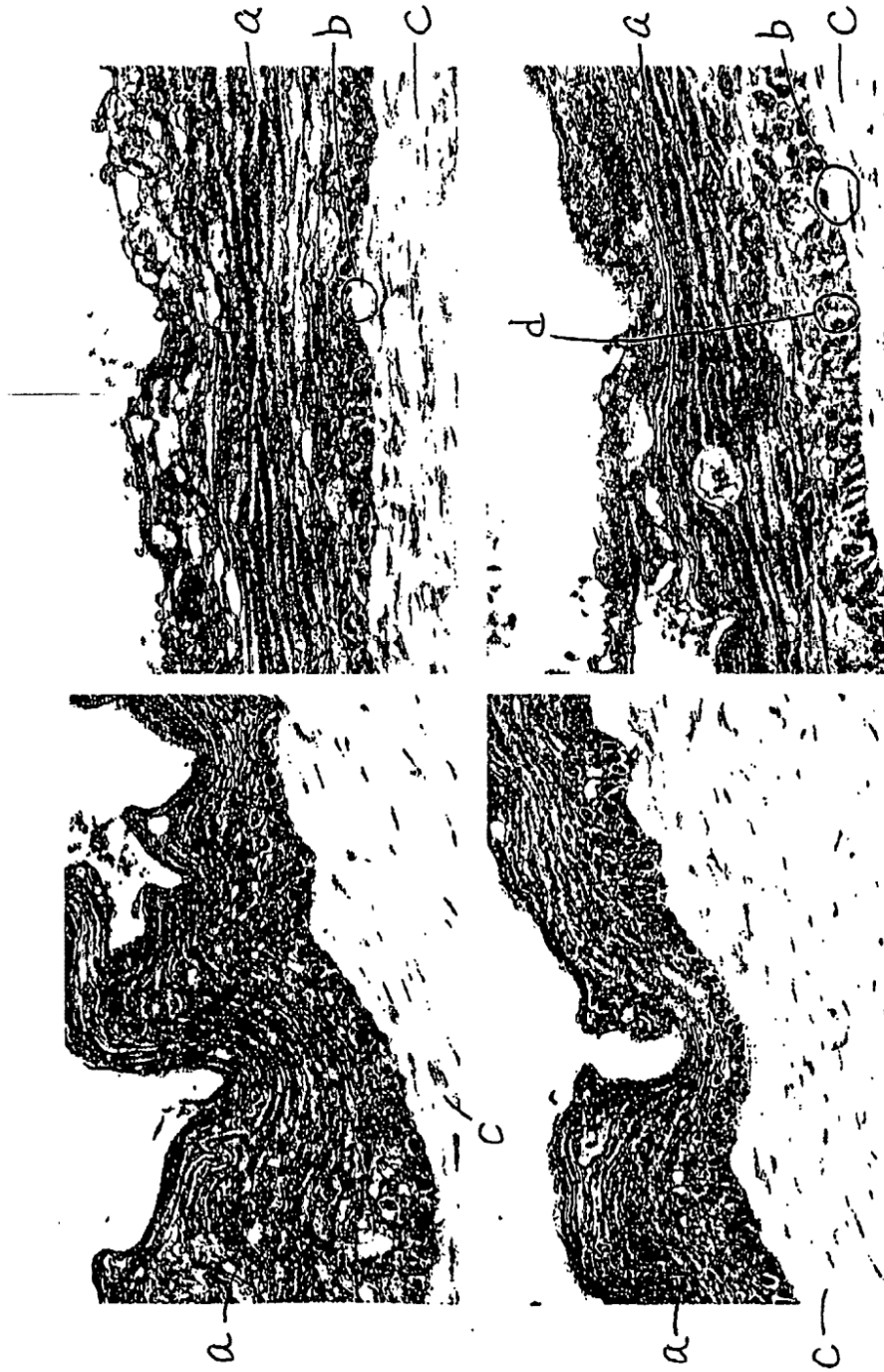




Fig. 6



*Fig. 7*



Recubrimiento con plata