

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 092**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2002 E 02725028 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 1404809**

54 Título: **Sustitutos de piel mejorados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

02.03.2001 US 273034 P

01.05.2001 US 287898 P

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

24.04.2014

73 Titular/es:

**STRATATECH CORPORATION (100.0%)
505 SOUTH ROSA ROAD
MADISON, WI 53719, US**

72 Inventor/es:

**COMER, ALLEN;
ALLEN-HOFFMANN, LYNN;
HOFFMANN, MICHAEL;
IVARIE, CATHY ANN-RASMUSSEN y
CONRAD, PAUL BARTH**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 457 092 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

Sustitutos de piel mejorados y usos de los mismos

5 [0001] Esta solicitud reivindica prioridad de las solicitudes de patente provisionales de Estados Unidos de números de serie 60/287,898, presentada el 5/01/2001 y 60/273,034, presentada el 3/02/2001 y las solicitudes de patente de Estados Unidos de números de serie no asignado presentada el 3/1/02 con Express Mail Label XXX, número de serie no asignado presentada el 3/1/02 con Express Mail Label XXX, y el número de serie no asignado presentada el 3/1/02 con Express Mail Label XXX. Esta solicitud de patente está apoyada en parte por las subvenciones de NIH SBIR 1 R43 AR47499-01 y 1 R43 ES10692-01A1.

10 **Campo de la invención**

15 [0002] La presente invención se refiere a sustitutos de la piel cultivados in vitro, y en particular a sustitutos de la piel cultivados in vitro que presentan una función de barrera mejorada tal como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la función de barrera mejorada es el resultado de condiciones de cultivo mejoradas, mientras que en otras realizaciones, la función de barrera mejorada resulta de la modificación genética de los queratinocitos. La presente invención se refiere además al uso de dichos sustitutos de piel para analizar la irritante.

20 **Antecedentes de la invención**

25 [0003] Existe un amplio mercado para productos y servicios de análisis que predicen los efectos de la función de barrera de la piel. Existe una particular necesidad de ensayos validados que permitirían a compañías con compuestos en una fase temprana analizar la función de barrera sin recurrir a pruebas caras de parches en humanos y animales. Las compañías cosméticas gastan aproximadamente de 50 millones a 100 millones de dólares por año en este tipo de ensayo. Las compañías de productos domésticos y farmacéuticas tienen gastos similares.

30 [0004] Además, existe un mercado sustancial para productos para terapia de las quemaduras y para la reparación o soporte de tejidos epiteliales apropiados y otros usos de cicatrización de heridas y de la piel. Por ejemplo, las úlceras venosas en las piernas afectan a aproximadamente 1 millón de personas en los Estados Unidos y 3 millones a nivel mundial, y otras afecciones ulcerosas, tales como las úlceras diabéticas y las úlceras por presión ("bedsore"), afectan aproximadamente a 10 millones de personas a nivel mundial. El cuidado habitual de las úlceras venosas puede llevar más de 6 meses para curar una herida y el coste puede sobrepasar los 10.000 dólares. Además, las úlceras en los pies son la causa principal de la hospitalización entre diabéticos y se estima que tiene un coste anual para el sistema de salud de Estados Unidos de más de 1.000 millones de dólares. Las estimaciones para las hospitalizaciones anuales por quemaduras en los Estados Unidos puede variar de 60.000 a 80.000 y los costes para la recuperación de las lesiones agudas varían de 36.000 a 117.000 dólares por paciente.

40 [0005] La función principal de la piel humana es proporcionar una barrera para la pérdida de agua transcutánea y una barrera para prevenir la entrada de compuestos tóxicos o microorganismos. El desarrollo de la barrera de permeabilidad epidérmica requiere la síntesis coordinada y el metabolismo de productos proteicos y lipídicos específicos de los queratinocitos que se ensamblan en la capa de la piel más externa, el estrato córneo. La expresión de muchas de las enzimas clave requeridas para la síntesis de estos lípidos extracelulares se regula por incremento durante la diferenciación de los queratinocitos o después de la alteración de la función de barrera epidérmica, lo que sugiere la existencia de factores de transcripción que actúan para inducir el desarrollo de la función de barrera (Sando et al., J. Biol. Chem., 271(36): 22044-51 (1996); Watanabe et al., J. Biol. Chem., 273(16): 9651-5 (1998)). La función de barrera se ve disminuida por la exposición a sustancias irritantes, por la infección y por un conjunto de enfermedades que incluyen dermatitis atópica y psoriasis. El estrés del entorno puede exacerbar los efectos de estas afecciones en la función de barrera esencial de la piel. Muchas industrias están interesadas en qué efecto tienen sus productos en la función de barrera de la piel. Por ejemplo, las compañías que suministrar compuestos farmacéuticos por vía transdérmica necesitan facilitar la penetración del agente activo a través de la barrera. Las compañías cosméticas están interesadas en hallar formulaciones que mejorar la función de la barrera.

55 [0006] A efectos de ensayar compuestos o formulaciones de manera temprana en el proceso de desarrollo con velocidad y precisión, sería beneficioso tener un sistema de ensayo in vitro que mimetice las propiedades de barrera de la piel humana. Sin embargo, los estudios publicados indican que los cultivos equivalentes de piel existentes, tales como EPIDERM, SKINETHICS o EPISKIN, presentan una función de barrera muy escasa (Ponec et al., J. Invest. Dermatol., 109(3): 348-55 (1997)). Sin embargo, existe un progreso reciente sustancial en el entendimiento de la importancia de la vitamina C, receptores nucleares de hormonas, síntesis de lípidos, y humedad en el desarrollo correcto de la función barrera (Ponec et al., J. Invest. Dermatol., 109(3): 348-55 (1997); Denda et al., J. Invest. Dermatol., 111(5): 858-63 (1998); Hanley et al., J. Clin. Invest., 100(3): p. 705-12 (1997); Hanley et al., J. Invest. Dermatol., 113 (5): 788-95 (1999)). En muchos casos, estos estudios se centran en las señales químicas o ambientales que desencadenan el programa de desarrollo natural que establece la función de barrera en un tiempo específico *in utero*. Claramente, existe una gran necesidad de sustitutos de la piel que tengan una función de barrera mejorada.

Descripción resumida de la invención

[0007] La presente invención se refiere a composiciones tal como se define en las reivindicaciones.

5 [0008] La presente invención proporciona composiciones que comprende un equivalente de piel humano, teniendo el equivalente de piel una capacitancia eléctrica de superficie de 40 a 240 pF. En algunas realizaciones preferidas, el equivalente de piel tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 pF. El contenido combinado de ceramidas 5, 6, y 7 en el equivalente de piel es del 20 al 50% del contenido total de ceramida. En otras realizaciones preferidas, el contenido de ceramida 2 en el equivalente de piel es del 10 al 40% del contenido total de ceramida. La presente solicitud proporciona realizaciones adicionales que no forman parte de la invención.

15 [0009] En algunas realizaciones, la presente solicitud proporciona queratinocitos aislados que comprenden una secuencia que codifica GKLF unido operativamente a un promotor exógeno. En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona queratinocitos de un cultivo organotípico que comprenden una secuencia que codifica GKLF exógeno unido operativamente un promotor exógeno.

20 [0010] En algunas realizaciones, la presente solicitud proporciona métodos para fabricar equivalentes de piel que tienen una función de barrera mejorada. En algunas realizaciones, los métodos comprenden proporcionar queratinocitos y un medio de cultivo que comprende ácido ascórbico y ácido linoleico; y cultivar los queratinocitos bajo condiciones tales que se forma un equivalente de piel con una función de barrera mejorada. En algunas realizaciones, las condiciones de cultivo incluyen cultivo a aproximadamente 50 al 95% de humedad, preferiblemente aproximadamente el 75% de humedad. En algunas realizaciones preferidas, el ácido ascórbico se proporciona a una concentración de aproximadamente 10 a 100 microgramos/ml. En realizaciones adicionales preferidas, el ácido linoleico se proporciona en una concentración de aproximadamente 5 a 80 micromolar. La presente solicitud no se limita a equivalentes de piel formados a partir de una fuente particular de queratinocitos. De hecho, los equivalentes de piel se pueden formar a partir de una variedad de queratinocitos primarios e inmortales, que incluyen, pero sin limitación, células NIKS. En otras realizaciones, los queratinocitos expresan GKLF exógeno de tipo natural o variante. En otras realizaciones, los queratinocitos derivan de dos fuentes diferentes. En otras realizaciones, el equivalente de piel tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 40 a aproximadamente 240 pF. En algunas realizaciones preferidas, el equivalente de piel tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 pF. En otras realizaciones preferidas, el contenido de ceramidas 5, 6, y 7 en el equivalente de piel es de aproximadamente 20 a aproximadamente 50% del contenido total de ceramida. En otras realizaciones preferidas, el contenido de ceramida 2 en el equivalente de piel es de aproximadamente 10 a aproximadamente 40% del contenido total de ceramida. En otras realizaciones, la presente invención proporciona el equivalente de piel fabricado mediante el método que se acaba de describir.

35 [0011] En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona métodos de fabricación de equivalentes de piel que tienen una función de barrera mejorada, que comprende: proporcionar queratinocitos y una construcción de ADN que comprende una secuencia que codifica GKLF unido operativamente a un promotor exógeno; transfectar los queratinocitos con dicha construcción de ADN para proporcionar queratinocitos transfectados; y cultivar los queratinocitos transfectados bajo condiciones tales que se forma el equivalente de piel con una función de barrera mejorada. En algunas realizaciones, la etapa de cultivo comprende cultivar los queratinocitos transfectados en un medio de cultivo que comprende ácido ascórbico y ácido linoleico. En algunas realizaciones preferidas, el ácido ascórbico se proporciona a una concentración de aproximadamente 10 a 100 microgramos/ml. En realizaciones adicionales preferidas, el ácido linoleico se proporciona en una concentración de aproximadamente 5 a 80 micromolar. La presente solicitud no se limita a equivalentes de piel formados a partir de una fuente particular de queratinocitos. De hecho, los equivalentes de piel se pueden formar a partir de una variedad de queratinocitos primarios e inmortales, que incluyen, pero sin limitación, células NIKS. En otras realizaciones, los queratinocitos expresan GKLF de tipo natural o variante. En otras realizaciones, los queratinocitos derivan de dos fuentes diferentes. En otras realizaciones, el equivalente de piel tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 40 a aproximadamente 240 pF. En algunas realizaciones preferidas, el equivalente de piel tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 pF. En otras realizaciones preferidas, el contenido de ceramidas 5, 6, y 7 en el equivalente de piel es de aproximadamente 20 a aproximadamente 50% del contenido total de ceramida. En otras realizaciones preferidas, el contenido de ceramida 2 en el equivalente de piel es de aproximadamente 10 a aproximadamente 40% del contenido total de ceramida. En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona el equivalente de piel fabricado mediante los métodos descritos.

60 [0012] En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona métodos para cribar compuestos. En algunas realizaciones, los métodos comprenden proporcionar un equivalente de piel que tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 40 a aproximadamente 240 pF; y tratar el equivalente de piel con dicho compuesto. En realizaciones adicionales, el método comprende la etapa c) analizar el efecto de dicho compuesto sobre dicho equivalente de piel. En algunas realizaciones preferidas, el compuesto se selecciona de una biblioteca combinatoria. La presente solicitud no se limita a equivalentes de piel formados a partir de una fuente particular de queratinocitos. De hecho, los equivalentes de piel se pueden formar a partir de una variedad de queratinocitos primarios e

inmortales, que incluyen, pero sin limitación, células NIKS. En otras realizaciones, los queratinocitos expresan GKLf exógeno de tipo natural o variante. En otras realizaciones, los queratinocitos derivan de dos fuentes diferentes. En otras realizaciones, el equivalente de piel tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 40 a aproximadamente 240 pF. En algunas realizaciones preferidas, el equivalente de piel tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 pF. En otras realizaciones preferidas, el contenido de ceramidas 5, 6, y 7 en el equivalente de piel es de aproximadamente 20 a aproximadamente 50% del contenido total de ceramida. En otras realizaciones preferidas, el contenido de ceramida 2 en el equivalente de piel es de aproximadamente 10 a aproximadamente 40% del contenido total de ceramida.

[0013] En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona kits que comprenden por lo menos un equivalente de piel que tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 40 a aproximadamente 240 pF. En otras realizaciones, el kit incluye medios de cultivo para cultivar dicho por lo menos un equivalente de piel. En algunas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para cultivar el equivalente de piel. En otras realizaciones, el kit comprende además instrucciones para analizar los compuestos utilizando dicho por lo menos un equivalente de piel. La presente invención no se limita a equivalentes de piel formados a partir de una fuente particular de queratinocitos. De hecho, los equivalentes de piel se pueden formar a partir de una variedad de queratinocitos primarios e inmortalizados, que comprenden por lo menos células NIKS. En otras realizaciones, los queratinocitos expresan GKLf de tipo natural o variante. En otras realizaciones, los queratinocitos derivan de dos fuentes diferentes. En otras realizaciones, el equivalente de piel tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 pF. En algunas realizaciones preferidas, el equivalente de piel tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 pF. En otras realizaciones preferidas, el contenido de ceramidas 5, 6, y 7 en el equivalente de piel es de aproximadamente 20 a aproximadamente 50% del contenido total de ceramida. En otras realizaciones preferidas, el contenido de ceramida 2 en el equivalente de piel es de aproximadamente 10 a aproximadamente 40% del contenido total de ceramida.

[0014] En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona un método de cribado de compuestos sospechosos de ser irritantes para la piel, que comprende: proporcionar un compuesto sospechoso de ser irritante para piel; un equivalente de piel que comprende una construcción génica informadora sensible a irritante; y poner en contacto dicho equivalente de piel con dicho compuesto; y medir el nivel de expresión génica de dicha construcción génica informadora. En algunas realizaciones, el equivalente de piel humana tiene una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 pF. En algunas realizaciones, el contenido de ceramidas 5, 6, y 7 en el equivalente de piel es de aproximadamente 20 a aproximadamente 50% del contenido total de ceramida. En otras realizaciones, el contenido de ceramida 2 en dicho equivalente de piel es de aproximadamente 10 a aproximadamente 40% del contenido total de ceramida. En algunas realizaciones, el equivalente de piel comprende queratinocitos seleccionados del grupo que consiste en queratinocitos primarios y queratinocitos inmortalizados. En algunas realizaciones, los queratinocitos inmortalizados son células NIKS. En otras realizaciones, los queratinocitos expresan GKLf heterólogo. En otras realizaciones, la construcción informadora sensible a la irritante comprende por lo menos una parte de un gen seleccionado del grupo que consiste en interleuquina-8 e interleuquina-1 α . En alguna realización preferida, la parte comprende una región reguladora.

[0015] La presente solicitud también proporciona una composición que comprende células NIKS que comprenden una construcción génica informadora sensible a irritante. En algunas realizaciones, las células NIKS tienen una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 40 a aproximadamente 240 pF. En otras realizaciones, las células NIKS tienen una capacitancia eléctrica de superficie de aproximadamente 80 a aproximadamente 120 pF. En algunas realizaciones, el contenido combinado de ceramidas 5, 6, y 7 en las células NIKS es de aproximadamente 20 a aproximadamente 50% del contenido total de ceramida. En otras realizaciones, el contenido de ceramida 2 en dichas células NIKS es de aproximadamente 10 a aproximadamente 40% del contenido total de ceramida. En otras realizaciones, las células NIKS expresan GKLf heterólogo. En algunas realizaciones, las células NIKS comprenden además una construcción de ADN que comprende una secuencia que codifica GKLf unido operativamente a un promotor exógeno. En otras realizaciones, las células NIKS comprenden además queratinocitos derivados de dos fuentes diferentes. En otras realizaciones, las células NIKS están presentes como una aplicación de cultivo organotípico.

[0016] En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona un método de identificación de genes sensibles a la irritante, que comprende: proporcionar un compuesto irritante para la piel; una matriz de expresión de genes; y un equivalente de piel; y poner en contacto dicho compuesto irritante para la piel con dicho equivalente de piel para generar un equivalente de piel tratado con irritante; aislar una primera muestra de ARNm de dicho equivalente de piel tratado con irritante y una segunda muestra de ARNm de dicho equivalente de piel; poner en contacto dicha primera y segunda muestras de ARNm con dicha matriz de expresión de genes; analizar dicha matriz de expresión de genes bajo condiciones en las que se determinan la identidad de los genes que se expresan a niveles mayores en dicho equivalente de piel tratado con irritante que en dicho equivalente de piel. En algunas realizaciones, el equivalente de piel comprende queratinocitos humanos cultivados. En otras realizaciones, los queratinocitos humanos cultivados están presentes como un cultivo organotípico. En algunas realizaciones, la construcción informadora sensible a irritante comprende por lo menos una parte de un gen seleccionado del grupo que consiste en interleuquina-8 e interleuquina-1 α . En algunas realizaciones preferidas, la parte comprende una región reguladora. En algunas realizaciones, la matriz de genes comprende secuencias de ADNc humanas.

5 [0017] La presente solicitud también proporciona sustitutos de piel cultivados in vitro y, en particular, métodos mejorados para el cultivo organotípico de sustitutos de piel. En algunas realizaciones, la presente solicitud proporciona procesos para preparar un equivalente dérmico sembrado que comprende: proporcionar un equivalente dérmico, queratinocitos, y medios de cultivo que tienen una interfase de aire: cultivar el equivalente dérmico en los medios de cultivo; levantar el equivalente dérmico a la interfase con aire para proporcionar un equivalente dérmico elevado; y sembrar el equivalente dérmico con los queratinocitos para proporcionar un equivalente dérmico sembrado. Se contempla la utilización de queratinocitos de una variedad de fuentes, incluyendo, pero sin limitación, queratinocitos seleccionados del grupo que consiste en queratinocitos humanos primario y queratinocitos humanos inmortalizados. En algunas realizaciones particularmente preferidas, los queratinocitos inmortalizados son células NIKS. En algunas realizaciones preferidas, el equivalente dérmico comprende colágeno y fibroblastos. Se contempla la utilización de una variedad de tipos de colágeno, incluyendo, pero sin limitación, colágeno de tendón de cola de rata. Asimismo, se contempla la utilización de una variedad de fibroblastos, incluyendo, pero sin limitación, células NHDF. En algunas realizaciones particularmente preferida, la etapa de elevación comprende además incubar el equivalente dérmico elevado en la interfase de aire durante por lo menos seis horas antes del sembrado. En otras realizaciones particularmente preferidas, la etapa de elevación comprende además incubar el equivalente dérmico elevado en la interfase de aire durante por lo menos doce horas antes del sembrado. En otras realizaciones particularmente preferidas, la etapa de elevación comprende además incubar el equivalente dérmico elevado en la interfase de aire durante por lo menos dieciocho horas antes del sembrado. En realizaciones más preferidas, la etapa de elevación comprende además incubar el equivalente dérmico elevado en la interfase de aire durante aproximadamente 24 horas antes del sembrado. En otras realizaciones preferidas, la etapa de elevación comprende además incubar el equivalente dérmico elevado en la interfase de aire durante aproximadamente seis horas antes del sembrado.

25 [0018] En algunas realizaciones, los métodos de la presente solicitud comprenden además la etapa de incubar el equivalente de piel dérmica sembrada bajo condiciones en las que se forma un equivalente de piel. En algunas realizaciones preferidas, el equivalente de piel está estratificado. En realizaciones particularmente preferidas, el equivalente de piel está estratificado sobre el epitelio escamoso. En otras realizaciones, la presente invención proporciona equivalentes dérmicos sembrados y equivalentes de piel producidos mediante los métodos anteriores.

30 [0019] En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona composiciones que comprenden una cámara de crecimiento que tiene una superficie de base porosa y una pared lateral, teniendo la base porosa sobre la misma un equivalente dérmico en la que el equivalente dérmico está sustancialmente adherido a la pared lateral de la cámara de crecimiento. La presente solicitud no se limita a cámaras de crecimiento de cualquier tamaño particular. De hecho, se contemplan cámaras de crecimiento de una variedad de tamaños. En algunas realizaciones preferidas, la base porosa de la cámara de crecimiento es de aproximadamente 0,1 a 20,0 centímetros de diámetro. En otras realizaciones preferidas, la base porosa de la cámara de crecimiento es de aproximadamente 1,0 centímetros de diámetro. En algunas realizaciones preferidas, el equivalente dérmico comprende colágeno y fibroblastos. Se contempla la utilización de una variedad de tipos de colágeno, incluyendo, pero sin limitación, colágeno de tendón de cola de rata. Asimismo, se contempla la utilización de una variedad de fibroblastos, incluyendo, pero sin limitación, células NHDF. En algunas realizaciones, la composición comprende además queratinocitos; en la que los queratinocitos se siembran sobre el equivalente dérmico para formar un equivalente de piel. Se contempla la utilización de queratinocitos de una variedad de fuentes, incluyendo, pero sin limitación, seleccionados del grupo que consiste en queratinocitos humanos primarios y queratinocitos humanos inmortalizados. En algunas realizaciones particularmente preferidas, los queratinocitos inmortalizados son células NIKS. En algunas realizaciones preferidas, los queratinocitos están estratificados. En realizaciones particularmente preferidas, los queratinocitos están estratificados sobre el epitelio escamoso.

50 [0020] En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona una composición que comprende un equivalente dérmico, en la que el equivalente dérmico contiene de aproximadamente 0,2 mg de colágeno por centímetro cuadrado del equivalente dérmico a 2,0 mg de colágeno por centímetro cuadrado del equivalente dérmico. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el equivalente dérmico contiene de aproximadamente 0,22 mg de colágeno por centímetro cuadrado del equivalente dérmico a 1,0 mg de colágeno por centímetro cuadrado del equivalente dérmico. En otras realizaciones particularmente preferidas, el equivalente dérmico contiene aproximadamente 0,5 mg de colágeno por centímetro cuadrado del equivalente dérmico. En algunas realizaciones, la composición comprende además queratinocitos, en la que los queratinocitos se siembran sobre el equivalente dérmico para formar un equivalente de piel. Se contempla la utilización de queratinocitos de una variedad de fuentes, incluyendo, pero sin limitación, queratinocitos seleccionados del grupo que consiste en queratinocitos humanos primarios y queratinocitos humanos inmortalizados. En algunas realizaciones particularmente preferidas, los queratinocitos inmortalizados son células NIKS. En algunas realizaciones preferidas, los queratinocitos están estratificados. En realizaciones particularmente preferidas, los queratinocitos están estratificados sobre el epitelio escamoso. En algunas realizaciones preferidas, el equivalente dérmico comprende colágeno y fibroblastos. Se contempla la utilización de una variedad de tipos de colágeno, incluyendo, pero sin limitación, colágeno de tendón de cola de rata. Asimismo, se contempla la utilidad de una variedad de fibroblastos, incluyendo, pero sin limitación, células NHDF.

[0021] En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona una composición que comprende BSA, isoproterenol, carnitina, serina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, α -tocoferol, ácido ascórbico, y EGF. Las cantidades de estos compuestos pueden variar. En realizaciones preferidas, la BSA, isoproterenol, carnitina, serina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, α -tocoferol, ácido ascórbico, y EGF están presentes en concentraciones suficientes para mejorar la función de barrera en equivalentes de piel cultivados in vitro. En algunas realizaciones, la composición comprende además suero. En otras realizaciones, las composiciones comprenden además cloruro de calcio, hidrocortisona, toxina de cólera, insulina y adenina. En realizaciones preferidas, la albúmina de suero bovino se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,1-10,0 mg/ml. En otras realizaciones preferidas, el isoproterenol se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,1-10,0 μ M. En otras realizaciones preferidas, la carnitina se proporciona a una concentración de aproximadamente 1,0-100,0 μ M. En más realizaciones preferidas, la serina se proporciona a una concentración de aproximadamente 1,0 -100,0 μ M. En más realizaciones preferidas, el ácido oleico se proporciona a una concentración de aproximadamente 1,0 – 100,0 μ M. En otras realizaciones preferidas, el ácido linoleico se proporciona a una concentración de aproximadamente 1,0-100,0 μ M. En algunas realizaciones preferidas, el ácido araquidónico se proporciona a una concentración de aproximadamente 1,0-100,0 μ M. En otras realizaciones preferidas, el α -tocoferol se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,1-10,0 μ M. En otras realizaciones preferidas, el ácido ascórbico se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,005 – 5,0 mg/ml. En otras realizaciones preferidas, el factor de crecimiento epidérmico se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,1-10,0 ng/mL.

20 Descripción de las figuras

[0022]

La figura 1 es la secuencia de ácido nucleico para Klf4 de ratón (SEQ ID NO:1).

La figura 2 es la secuencia de ácidos nucleicos para GKLF humano (SEQ ID NO:2)

La figura 3 muestra la secreción de IL-1 α por cultivos organotípicos de NIKS.

La figura 4 proporciona una representación de los pocillos de cultivo de algunas realizaciones de la presente solicitud.

30 Definiciones

[0023] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "GKLF", cuando se utiliza en referencia a una proteína o ácido nucleico se refiere a una proteína o ácido nucleico que codifica una proteína que comparte más de aproximadamente el 50% de identidad con la SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:2 y se une al elemento de transcripción básico del promotor del citocromo p450IAI. La actividad de unión se puede analizar convenientemente mediante un ensayo de desplazamiento del gel por movilidad electroforética utilizando el oligonucleótido GAGAAGGAGGCGTGGCCAAC (SEQ ID NO:3) tal como se describe en Zhang et al., J. Biol. Chem., 273(28): 17917-25 (1998). De este modo, el término GKLF abarca proteínas que son idénticas a GKLF de tipo natural y aquellas que derivan de GKLF de tipo natural (por ejemplo, variantes de GKLF o genes quiméricos construidos con partes de regiones codificantes de GKLF).

[0024] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "actividad de GKLF" se refiere a cualquier actividad de GKLF de tipo natural. El término pretende comprender todas las actividades de GKLF.

[0025] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "equivalente de la piel" y "sustituto de la piel" se utilizan indistintamente para referirse a un cultivo derivado in vitro de queratinocitos que se ha estratificado en el epitelio escamoso en lo que se denomina un cultivo organotípico.

[0026] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "equivalente dérmico" se utiliza para referirse a un cultivo derivado in vitro que comprende colágeno y células de fibroblastos. Se contempla que "los equivalentes dérmicos" pueden servir como sustratos para la diferenciación de queratinocitos en un cultivo organotípico.

[0027] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "interfase de aire" se refiere a la interfase entre la atmósfera y el medio líquido en una placa de cultivo.

[0028] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustancialmente adherido a una pared lateral", cuando se utiliza en referencia a un equivalente dérmico, se refiere a la adherencia física de un equivalente dérmico a una pared sustancialmente vertical, en oposición al equivalente dérmico que se contrae o se aleja de la pared sustancialmente vertical.

[0029] Tal como se utiliza en el presente documento, el término cultivo "organotípico" se refiere a un cultivo de tejido tridimensional en el que las células cultivadas se utilizan para reconstruir un tejido u órgano in vitro.

[0030] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "células NIKS" se refiere a células que tienen las características de las células depositadas como la línea celular ATCC CRL-12191.

[0031] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "NHDF" se refiere a células que tienen las características de fibroblastos dérmicos humanos normales.

5 **[0032]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "contenido de ceramidas" se refiere a la cantidad de ceramidas en una muestra de equivalente de piel tal como se analiza mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento.

10 **[0033]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "irritante de la piel" se refiere a un compuesto que, cuando se aplica a la piel o equivalentes de la piel, produce una respuesta celular caracterizada por la expresión de un "gen sensible a la irritante". Ejemplos de irritantes de la piel incluyen, pero sin limitación, SDS, calcipotriol, y ácido trans-retinoico. El término "irritante de la piel" también pretende comprender irritantes no conocidos o sospechosos, incluyendo, pero sin limitación, los que están contenidos en algunos productos farmacéuticos, cosméticos y de consumo.

15 **[0034]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "gen sensible a la irritante" se refiere a un gen que se expresa hasta un nivel superior (por ejemplo, medido por el nivel de expresión de ARNm) en presencia de un irritante de la piel. Ejemplos de genes sensibles a la irritante incluyen, pero sin limitación, Interleuquina-8 e Interleuquina-1 α . El término "gen sensible a la irritante" también pretende comprender genes sensibles a la irritante no conocidos (por ejemplo, los identificados por lo métodos de la presente solicitud).

20 **[0035]** El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor (por ejemplo, GKLF). El polipéptido se puede codificar por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquiera parte de la secuencia codificante, siempre que se mantengan la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligando, transducción de señales, etc.) de la longitud completa o del fragmento. El término también comprende la región codificante de un gen estructural y las secuencias incluyentes localizadas adyacentes a la región codificante en ambos extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 kb en cualquiera de los extremos, de manera que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. A las secuencias que se localizan 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se refieren como secuencias 5' no traducidas. A las secuencias que se localizan 3' o región en dirección 3' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se refieren como secuencias 3' no traducidas. El término "gen" comprende ADNc y formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones de intervención" o "secuencias de intervención". Los intrones son segmentos de un gen que se transcribe en ARN nuclear (hnRNA); los intrones pueden contener elementos reguladores, tales como potenciadores. Los intrones se extraen o "se separan por empalme" del transcrito nuclear o primario; los intrones, por tanto, están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia u ordenar los aminoácidos en un polipéptido a producir.

35 **[0036]** En particular, el término "gen de GKLF" se refiere a la secuencia de nucleótidos de GKLF de longitud completa (por ejemplo, contenida en la SEQ ID NO:2). Sin embargo, también se pretende que el término comprenda fragmentos de la secuencia de GKLF, así como otros dominios en la secuencia de nucleótidos de GKLF de longitud completa. Además, los términos "secuencia de nucleótidos de GKLF" o "secuencia de polinucleótidos de GKLF" comprende las secuencia de ADN, ADNc, y ARN (por ejemplo, ARNm).

40 **[0037]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "grupo de genes" o "matriz de genes" se refiere a un soporte sólido (por ejemplo, un filtro, un portaobjetos de vidrio o un microchip) al que se fija una pluralidad de secuencias de ácido nucleico. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "matriz de expresión de genes" se refiere a una matriz de genes para utilizar en la medición de la expresión de genes que están contenidos en la matriz. En realizaciones preferidas, las secuencias de ácidos nucleicos fijadas a una matriz de expresión de genes son secuencias de ADNc.

45 **[0038]** Cuando se indica la secuencia de aminoácidos en este documento para referirse a una secuencia de aminoácidos de una molécula proteica natural, una secuencia de aminoácidos, y términos similares, tales como polipéptido o proteína, no se desea limitar la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos completa nativa asociada con la molécula proteica indicada.

50 **[0039]** Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen pueden incluir también secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se refieren como secuencias o regiones "flanqueantes" (estas secuencias flanqueantes se localizan en 5' o 3' con respecto a las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARNm). La región flanqueante 5' puede contener secuencias reguladoras, tales como promotores y potenciadores, que controlan o incluyen en la transcripción del gen. La región flanqueante 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, la separación después de la transcripción y la poliadenilación.

55 **[0040]** El término "tipo natural" se refiere a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o

producto génico cuando se aísla de una fuente natural. Un gen de tipo natural es aquel que se observa más frecuentemente en una población y, de este modo, se diseña la forma "normal" o "de tipo natural" del gen. En cambio, los términos "modificado", "mutante", y "variante" se refieren a un gen o producto génico que muestra modificaciones en la secuencia y/o propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto génico de tipo natural. Cabe indicar que se pueden aislar los mutantes naturales; se identifican por el hecho de que tienen características alteradas cuando se comparan con el gen o producto génico de tipo natural.

[0041] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "molécula de ácido nucleico codificante" "secuencia de ADN codificante" y "ADN codificante" se refieren al orden o secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una cadena de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica (proteínica). De este modo, la secuencia de ADN codifica la secuencia de aminoácidos.

[0042] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen" y "polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen" significa una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la región codificante de un gen o, en otras palabras, la secuencias de ácidos nucleicos que codifica un producto génico. La región codificante puede estar presente en forma de ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en forma de ADN, el oligonucleótido o polinucleótido pueden ser de cadena sencilla (es decir, la cadena de sentido) o de doble cadena. Se pueden colocar elementos de control adecuados, tales como potenciadores/promotores, uniones de empalme, señales de poliadenilación, etc., próximos a la región codificante del gen, si es necesario, para permitir el inicio correcto de la transcripción y/o el procesado correcto del transcrito de ARN primario. Alternativamente, la región codificante utilizada en los vectores de expresión de la presente solicitud pueden contener potenciadores/promotores endógenos, uniones de empalme, secuencias de intervención, señales de poliadenilación, etc., o una combinación de elementos de control endógenos y exógenos.

[0043] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "elemento regulador" se refiere a un elemento genético que controla algunos aspectos de la expresión de secuencias de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor es un elemento regulador que facilita la iniciación de la transcripción de una región codificante unida operativamente. Otros elementos reguladores incluyen señales de empalme, señales de poliadenilación, señales de terminación, etc.

[0044] Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "complementario" o "complementariedad" se utilizan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "5'-A-G-T-3'" es complementaria a la secuencia "3'-T-C-A-5'." La complementariedad puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases de los ácidos nucleicos están apareadas según las reglas del apareamiento de bases. O, puede haber una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre cadenas de ácido nucleico presenta efectos significativos en la eficacia y la fuerza de la hibridación entre cadenas de ácidos nucleicos. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como en los métodos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

[0045] El término "homología" se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber una homología parcial o una homología (es decir, identidad) completa. Una secuencia parcialmente complementaria es aquella que inhibe por lo menos parcialmente la hibridación de una secuencia completamente complementaria a un ácido nucleico diana y se le hace referencia utilizando el término funcional "sustancialmente homóloga". El término "inhibición de la unión", cuando se usa en referencia a la unión de ácidos nucleicos, se refiere a la inhibición de unión causada por la competición de las secuencias homólogas por la unión a una secuencia diana. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria a la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (transferencia de Southern o Northern, hibridación en solución y similares) bajo condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia o sonda sustancialmente homóloga competirá e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una secuencia completamente homóloga a una diana bajo condiciones de baja rigurosidad. Esto no quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad son tales que se permite la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de una unión no específica se puede analizar mediante el uso de una segunda diana que carece incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, menos de aproximadamente el 30% de identidad); en ausencia de una unión no específica, la sonda no se hibridará a la segunda diana no complementaria.

[0046] El sector conoce que se pueden utilizar numerosas condiciones equivalentes para comprender condiciones de baja rigurosidad; se consideran factores, tales como la longitud y la naturaleza (ADN, ARN, composición de bases) de la sonda y la naturaleza de la diana (ADN, ARN, composición de bases, presente en solución o inmovilizados, etc) y la concentración de las sales y otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de formamida, sulfato de dextrano, polietilenglicol), y se puede variar la solución de hibridación para generar condiciones de hibridación de baja rigurosidad diferentes de, pero equivalentes a, las condiciones mencionadas anteriormente. Además, el sector conoce las condiciones que promueven la hibridación bajo condiciones de alta

rigurosidad (por ejemplo, incrementando la temperatura de la hibridación y/o etapas de lavado, el uso de formamida en la solución de hibridación, etc).

5 [0047] Cuando se utiliza en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos de doble cadena, tal como ADNc o clon genómico, el término "sustancialmente homóloga" se refiere a cualquier sonda que se puede hibridar a una cadena o ambas cadenas de la secuencia de ácidos nucleicos de doble cadena bajo condiciones de baja rigurosidad descritas a continuación.

10 [0048] Cuando se utiliza en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla, el término "sustancialmente homóloga" se refiere a cualquier sonda que se puede hibridar (es decir, es el complemento de) a la secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla bajo condiciones de baja rigurosidad descritas anteriormente.

15 [0049] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "compite por la unión" se usa en referencia a un primer polipéptido con una actividad que se une al mismo sustrato que un segundo polipéptido con una actividad, en el que el segundo polipéptido es una variante del primer polipéptido o un polipéptido relacionado o diferente. La eficacia (por ejemplo, cinética o termodinámica) de la unión por el primer polipéptido puede ser la misma que, mayor que, o inferior que la eficacia de la unión del sustrato por el segundo polipéptido. Por ejemplo, la constante de unión en equilibrio (K_D) para la unión al sustrato puede ser diferente para los dos polipéptidos. El término " K_m ", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la constante de Michaelis-Menten para una enzima y se define como la concentración del sustrato específico a la que una enzima determinada produce la mitad de su velocidad máxima en una reacción catalizada por enzimas.

20 [0050] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hibridación" se utiliza en referencia al apareamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de hibridación (es decir, la fuerza de asociación entre los ácidos nucleicos) están afectados por factores, tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la T_f del híbrido formado, y la proporción G:C en los ácidos nucleicos.

25 [0051] Tal como se utiliza en el presente documento, el término " T_f " se usa en referencia a la "temperatura de fusión". La temperatura de fusión es la temperatura a la que una población de moléculas de ácido nucleico de doble cadena se disocia por la mitad en cadenas sencillas. La ecuación para calcular la T_f de ácidos nucleicos es bien conocida en la técnica. Tal como se indica por las referencias estándar, una estimación simple del valor de T_f puede calcularse mediante la ecuación: $T_f = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa a 1 M de NaCl (Véase, por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridization, in Nucleic Acid Hybridization [1985]). Otras referencias incluyen cálculos más sofisticados que tienen en cuenta características estructurales, así como características de secuencia para el cálculo de T_f .

30 [0052] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "rigurosidad" se usa en referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica, y la presencia de otros compuestos, tales como disolventes orgánicos, bajo las cuales se llevan a cabo las hibridaciones de ácidos nucleicos. Los expertos en la materia entenderán que las condiciones de "rigurosidad" pueden alterarse mediante la variación de los parámetros descritos, ya sea individualmente o conjuntamente. Con las condiciones de "alta rigurosidad", el apareamiento de bases de ácidos nucleicos sólo se producirá entre fragmentos de ácido nucleico que tienen una alta frecuencia de secuencias de bases complementarias (por ejemplo, la hibridación bajo condiciones de "alta rigurosidad" puede tener lugar entre homólogos con una identidad de aproximadamente 85-100%, preferiblemente una identidad de aproximadamente 70-100%). Con las condiciones de rigurosidad media, el apareamiento de bases de ácidos nucleicos se producirá entre los ácidos nucleicos con una frecuencia intermedia de secuencias de bases complementarias (por ejemplo, la hibridación bajo condiciones de "rigurosidad media" puede tener lugar entre homólogos con una identidad de aproximadamente el 50-70%). De este modo, se requieren a menudo condiciones de rigurosidad "débil" o "baja" con ácidos nucleicos que derivan de organismos que son genéticamente diversos, ya que la frecuencia de secuencias complementarias es normalmente menor.

35 [0053] "Condiciones de rigurosidad elevada", cuando se utiliza en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42°C en una solución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 1,85 g/l EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,5%, 5X reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una solución que comprende 0,1X SSPE, SDS al 1,0% a 42°C cuando se utiliza una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

40 [0054] "Condiciones de rigurosidad media", cuando se utiliza en referencia a la hibridación de ácidos nucleicos comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42°C en una solución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 1,85 g/l EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,5%, 5X reactivo de Denhardt y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una solución que comprende 1,0X SSPE, SDS al 1,0% a 42°C cuando se utiliza una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

[0055] "Condiciones de rigurosidad baja", comprenden condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42°C en una solución que consiste en 5X SSPE (43,8 g/l NaCl, 6,9 g/l NaH₂PO₄ H₂O y 1,85 g/l EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), SDS al 0,1%, 5X reactivo de Denhardt [50X solución de Denhardt contiene por 500 ml: 5 g Ficoll (Tipo 400, Pharamcia), 5 g BSA (Fracción V; Sigma)] y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de lavado en una solución que comprende 5X SSPE, SDS al 0,1% a 42°C cuando se utiliza una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

[0056] Los siguientes términos se utilizan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia de referencia", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", e "identidad sustancial".

Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de una secuencia de ADNc de longitud completa determinada en un listado de secuencias o puede comprender una secuencia génica completa. En general, una secuencia de referencia tiene por lo menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente por lo menos 25 nucleótidos de longitud, y a menudo por lo menos 50 nucleótidos de longitud. Dado que dos polinucleótidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una parte de la secuencia de polinucleótido completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan habitualmente comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de por lo menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos en el que una secuencia de polinucleótido puede compararse con una secuencia de referencia de por lo menos 20 nucleótidos contiguos y en el que la parte de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, espacios) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman [Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)] mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch [Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)], mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman [Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988)], mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección, y se selecciona la mejor alineación (es decir, que da lugar al mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generado por los diversos métodos. El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos son idénticas (es decir, sobre una base de nucleótido por nucleótido) sobre la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que aparecen idénticas las bases de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial", tal como se utiliza en el presente documento, indica una característica de una secuencia de polinucleótido, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene por lo menos un 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos un 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente por lo menos un 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de por lo menos 20 posiciones de nucleótidos, frecuentemente sobre una ventana de por lo menos 25-50 nucleótidos, en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia de polinucleótido que puede incluir deleciones o adiciones que suman un total del 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de las secuencias de longitud completa de las composiciones de la presente solicitud (por ejemplo, GKLF).

[0057] Tal como se aplica a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando las ponderaciones de los espacios por defecto, comparten por lo menos el 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos el 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente por lo menos el 95 por ciento de identidad de secuencia o más (por ejemplo, el 99 por ciento de identidad de secuencia). Preferiblemente, las posiciones de los residuos que no son idénticas difieren en sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida cadenas es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contiene azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina.

[0058] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "molécula de ADN recombinante" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula de ADN que está comprendida de segmentos de ADN unidos mediante técnicas de biología molecular.

5 **[0059]** El término "aislado" cuando se usa en relación con un ácido nucleico, como en "un oligonucleótido aislado" o "polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se identifica y separa de por lo menos un ácido nucleico contaminante que está asociado normalmente en su fuente natural. El ácido nucleico aislado está presente en una forma o configuración que es diferente de aquella con la que se encuentra en la naturaleza. En cambio, los ácidos nucleicos no aislados son ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN, que se encuentran en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN determinada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula huésped en la proximidad de genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con numerosos otros ARNm que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, el ácido nucleico aislado que codifica GKLf incluye, a modo de ejemplo, dicho ácido nucleico en células que expresan normalmente GKLf donde el ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales, o en cualquier caso, está flanqueado por una secuencia de ácido nucleico diferente de la que se encuentra en la naturaleza. El ácido nucleico, oligonucleótido, o polinucleótido aislado puede estar presentes en forma de una sola cadena o de doble cadena. Cuando un ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado se va a utilizar para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrán como mínimo la cadena de sentido o codificación (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero pueden contener las cadenas de sentido y anti-sentido (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser de doble cadena).

25 **[0060]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "parte" cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos (como en "una parte de una secuencia de nucleótidos determinada") se refiere a fragmentos de esa secuencia. Los fragmentos pueden variar en el tamaño de cuatro nucleótidos a la secuencia de nucleótidos completa menos un nucleótido (10 nucleótidos, 20, 30, 40, 50, 100, 200, etc.).

30 **[0061]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "región codificante" cuando se utiliza en referencia a un gen estructural se refiere a las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos hallados en el polipéptido generado como resultado de la traducción de una molécula de ARNm. La región codificante está unida, en eucariotas, en la parte 5' por el triplete de nucleótidos "ATG" que codifica la metionina iniciadora y en la parte 3' por uno de los tres tripletes que especifican los codones de parada (es decir, TAA, TAG, TGA).

35 **[0062]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "purificado" o "purificar" se refiere a la extracción de contaminantes de una muestra.

40 **[0063]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se utiliza en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren el segmento o segmentos de ADN de una célula a otra. El término "vehículo" a menudo se utiliza indistintamente con "vector."

45 **[0064]** El término "vector de expresión", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia codificante deseada y secuencias de ácido nucleico apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariontes incluyen normalmente un promotor, un operador (opcional), y un sitio de unión a ribosoma, a menudo junto con otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de terminación y poliadenilación.

50 **[0065]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "células huésped" se refiere a cualquier célula eucariota o procarionte (por ejemplo, células bacterianas, tales como E. coli, células de levadura, células de mamífero, células de ave, células de anfibio, células vegetales, células de peces y células de insectos), ya esté in vitro o in vivo. Por ejemplo, las células huésped se pueden localizar en un animal transgénico.

55 **[0066]** Los términos "sobrexpresión" y "que sobreexpresa" y equivalentes gramaticales, se usan en referencia a los niveles de ARNm para indicar un nivel de expresión aproximadamente 3 veces mayor que los observados habitualmente en un tejido determinado en un animal de control o no transgénico. Los niveles de ARNm se miden utilizando cualquiera de una serie de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, análisis de transferencia Northern. Se incluyen controles apropiados en la transferencia Northern para controlar las diferencias en la cantidad de ARN cargado de cada tejido analizado (por ejemplo, se puede utilizar la cantidad de 28S ARNr, un transcrito de ARN abundante presente en esencialmente la misma cantidad en todos los tejidos, presente en cada muestra, como un medio de normalización o estandarización de la señal de específica de ARNm de GKLf observada en las transferencias Northern). Se cuantifica la cantidad de ARNm presente en la banda correspondiente en tamaño al ARN del transgén de GKLf correctamente empalmado; en la cuantificación de la expresión del ARNm transgénico no se consideran otras especies menores de ARN que se hibridan a la sonda transgén.

65 **[0067]** El término "transfección", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la introducción de ADN

exógeno en células eucariotas. La transfección puede estar acompañada por un conjunto de medio conocidos en la técnica, que incluyen coprecipitación de ADN con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE dextrano, transfección mediada por polibreno, electroporación, microinyección, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral y biolística.

5 **[0068]** El término "transfección estable" o "transfectado de forma estable" se refiere a la introducción e integración de ADN exógeno en el genoma de la célula transfectada. El término "transfectante estable" se refiere a una célula que ha integrado de ADN exógeno de forma estable en el ADN genómico.

10 **[0069]** El término "transfección transitoria" o "transfectado de manera transitoria" se refiere a la introducción de ADN exógeno en una célula en la que el ADN exógeno no consigue integrarse en el genoma de la célula transfectada. El ADN exógeno permanece en el núcleo de la célula transfectada durante varios días. Durante este tiempo el ADN exógeno está sometido a controles reguladores que gobiernan la expresión de genes endógenos en los cromosomas. El término "transfectante transitorio" se refiere a células que captan ADN exógeno, pero no consiguen integrarse en este ADN.

15 **[0070]** El término "coprecipitación de fosfato de calcio" se refiere a una técnica para la introducción de ácidos nucleicos en una célula. La captación de ácidos nucleicos por las células aumenta cuando el ácido nucleico se presenta como un coprecipitado de fosfato de calcio y ácido nucleico. La técnica original de Graham y van der Eb (Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456 [1973]), se ha modificado por varios grupos para optimizar las condiciones de tipos particulares de células. El sector es consciente de estas numerosas modificaciones.

20 **[0071]** Una "composición que comprende una secuencia de polinucleótido determinada", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere ampliamente a cualquier composición que contiene la secuencia de polinucleótido determinada. La composición puede comprender una solución acuosa. Las composiciones que comprenden secuencias de polinucleótidos que codifican GSKF (por ejemplo, SEQ ID NO:2) o fragmentos de la misma se pueden utilizar como sondas de hibridación. En este caso, las secuencias de polinucleótidos que codifican GSKF se utilizan habitualmente en una solución acuosa que contiene sales (por ejemplo, NaCl), detergentes (por ejemplo, SDS), y otros componentes (por ejemplo, solución de Denhardt, leche en polvo, ADN de esperma de salmón, etc.).

25 **[0072]** El término "compuesto de prueba" se refiere a cualquier entidad química, medicina, fármaco y similares, que se puede utilizar para tratar o prevenir una enfermedad, afección, mal o trastorno de la función corporal, o que en cualquier caso altera el estado fisiológico o celular de una muestra. Los compuestos de prueba comprenden compuestos terapéuticos conocidos y potenciales. Se puede determinar que un compuesto de prueba sea terapéutico mediante el cribado utilizando los métodos de cribado de la presente solicitud. Un "compuesto terapéutico conocido" se refiere a un compuesto terapéutico que se ha demostrado (por ejemplo, a través de pruebas en animales o antes de experimentar con la administración en humanos) que es eficaz en dicho tratamiento o prevención.

30 **[0073]** El término "muestra", tal como se utiliza en el presente documento, se utiliza en el sentido más amplio. Una muestra sospechosa de contener un cromosoma humano o secuencias asociadas con un cromosoma humano puede comprender una célula, cromosomas aislados de células (por ejemplo, la propagación de cromosomas de metafase), ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido, tal como, para análisis de transferencia de Southern), ARN (en solución o unido a un soporte sólido, tal como, para análisis de transferencia de Northern), ADNc (en solución o unido a un soporte sólido) y similares. Una muestra sospechosa de contener una proteína puede comprender una célula, una parte de un tejido, un extracto que contiene una o más proteínas, y similares.

35 **[0074]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "respuesta", cuando se utiliza en referencia a un ensayo, se refiere a la generación de una señal detectable (por ejemplo, acumulación de proteína informadora, incremento en la concentración de iones, acumulación de un producto químico detectable).

40 **[0075]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "gen informador" se refiere a un gen que codifica una proteína que se puede analizar. Entre los ejemplos de genes informadores se incluyen, pero sin limitación, luciferasa (véase, por ejemplo, de Wet et al., *Mol. Cell. Biol.* 7:725 [1987] y las patentes de Estados Unidos 6,074,859; 5,976,796; 5,674,713; y 5,618,682), proteína verde fluorescente (por ejemplo, número de acceso GenBank U43284; un conjunto de variantes de GFP están disponibles comercialmente en CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA), cloramfenicol acetiltransferasa, -galactosidasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante.

45 **[0076]** Tal como se utiliza en el presente documento, El término "construcción génica informadora sensible a irritante" se refiere a una construcción que comprende un gen informador unido operativamente a una región reguladora de un gen sensible a irritante.

Descripción de la invención

50 **[0077]** La presente invención se refiere a composiciones tal como se define en las reivindicaciones. En otras realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprende sustitutos de piel que comprenden

construcciones génicas informadoras (es decir, construcciones génicas informadoras sensibles a irritante) tal como se define en las reivindicaciones.

5 **[0078]** La piel humana protege al cuerpo de agresiones ambientales, tales como los productos químicos y los microorganismos. También es fundamental para la prevención de la pérdida de agua de nuestro cuerpo. Los defectos en la función de barrera de la piel tienen efectos perjudiciales que conducen a la entrada de sustancias tóxicas, infecciones o una pérdida severa de agua. A veces, es deseable mejorar la función de barrera de la piel por razones médicas, de cuidado de bebés o cosméticas, mientras que en otras ocasiones sería ventajoso reducir la permeabilidad de la barrera; para administrar fármacos por vía transdérmica, por ejemplo. Las compañías farmacéutica, cosmética y de productos de consumo tienen todos productos que puedan entrar en contacto con la piel. Estas empresas necesitan saber pronto en el proceso de desarrollo si su compuesto o formulación afectarán a la función de barrera esencial de la piel. Se ha utilizado tejido de piel extirpado para medir la absorción percutánea, pero se han indicado en la literatura una serie de problemas con esta preparación. Existen diferencias en la absorción entre la piel humana y animal que puede dar lugar a resultados erróneos y la disponibilidad de tejido humano es variable. También existen presiones políticas y sociales crecientes para eliminar o reducir el número de animales utilizados para pruebas de seguridad.

20 **[0079]** Estas dificultades y la necesidad creciente de entender las propiedades de permeabilidad de nuevas formulaciones y potenciales agentes terapéuticos transdérmicos han conducido a muchos estudios para mejorar las propiedades de permeabilidad de cultivos de equivalentes de piel *in vitro*. El desarrollo de un sustituto de piel cultivado que recapitula las propiedades de barrera de piel humano también proporcionará una mejor fuente de tejido sintético para terapia para quemaduras. La disponibilidad de sustitutos de piel cultivados que más se parecen a la piel humana facilitará los ensayos de productos cosméticos, farmacéuticos y otros compuestos tópicos mediante la reducción de la dependencia de los ensayos en animales de estos productos.

25 **[0080]** El epitelio escamoso estratificado, tal como la piel y el epitelio oral, son tejidos de renovación multicapas compuestos principalmente de queratinocitos. Los queratinocitos diferenciados se pierden continuamente de la superficie y se sustituyen mediante la proliferación de queratinocitos basales. La velocidad a la que una célula basal inicia y completa su programa de diferenciación parece estar estrictamente regulada, aunque los controles moleculares para dicha regulación son confusos (Fuchs, *J. Cell. Sci. Suppl.*, 17: 197-208 (1993)). *In vivo*, las etapas finales del proceso de diferenciación terminal se caracterizan por numerosos cambios que incluyen el apilamiento de filamentos intermedios de queratina mediado por filagrina y la liberación de lípidos de los gránulos que recubren la membrana en el espacio intercelular (Schurer et al., *Dermatologica*, 183: 77-94 (1991)). La envoltura cornificada, otra estructura de diferenciación terminal que consiste en diversas proteínas que están reticuladas covalentemente mediante la acción de transglutaminasas dependientes de calcio, también se forma en la diferenciación de queratinocitos (Aeschlimann et al., *Thrombosis & Haemostasis*, 71 (4): 402-15 (1994); Reichert et al., *The Cornified Envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes*, in *Molecular Biology of the Skin*, M. Darmon, Editor. 1993, Academic Press, Inc.: San Diego. 107-150 (1993)). En la epidermis, los queratinocitos pierden orgánulos intracelulares y enuclean en las capas superiores del tejido, formando una "carcasa muerta" con una alta resistencia a la tracción. Los mecanismos moleculares que gobiernan la enucleación de queratinocitos y la diferenciación terminal están poco comprendidos. Los estudios ((Sachsenmeier et al., *J. Biol. Chem.*, 271: 5-8 (1996); Hines et al., *Promega Notes*, 59: p. 30-36 (1996); Hines et al., *J. Biol. Chem.*, 271(11): 6245-6251 (1996); Polakowska et al., *Developmental Dynamics*, 199(3): 176-88 (1994); Haake et al., *J. Invest. Derm. Symp. Proc.*, 3: 28-35 (1998)) sugieren que la diferenciación terminal en queratinocitos puede constituir una forma especial de muerte celular apoptótica.

50 **[0081]** La piel humana se compone de una capa dérmica que contiene fibroblastos incluidos en una matriz de proteína extracelular y una capa epidérmica, que consiste principalmente en queratinocitos que se diferencian para formar la capa impermeable más externa de la piel. La función principal de la piel humana es proporcionar una barrera física para evitar la pérdida excesiva de fluido corporal debido a la evaporación. La función de barrera está localizada en el estrato córneo de la piel. El estrato córneo ha sido descrito como una matriz de células rellenas de queratina impermeables incluida en una matriz de lípidos, análoga a un muro de ladrillo. Los componentes fundamentales de la barrera del estrato córneo son los lípidos depositados por los queratinocitos durante la formación del estrato córneo. En el estrato granuloso, los queratinocitos contienen gránulos de queratohialina y cuerpos lamelares. En la interfase del estrato granuloso/estrato córneo, los cuerpos lamelares se fusionan con la membrana plasmática y extruyen su contenido de lípidos en el espacio intercelular. También se libera un número de enzimas que sirven para procesar fosfolípidos y glucosilceramidas a ácidos grasos y ceramidas, respectivamente. Los lípidos extracelulares del estrato córneo se ensamblan en estructuras multilamelares que rodean las envolturas cornificadas rellenas de queratina producidas a partir de los queratinocitos. Los lípidos del estrato córneo comprenden 10-15% del peso seco del tejido y consisten principalmente (en peso) de ceramidas (50%), colesterol (25%) y ácidos grasos libres (10%) en cantidades aproximadamente equimolares (Wertz et al., *Chem. Phys. Lipid*, 91 (2): 85-96. (1998)). Estos lípidos derivan principalmente de la biosíntesis en los queratinocitos. Una parte de las ceramidas tiene el papel inusual de formar enlaces covalentes con grupos en la superficie de las envolturas cornificadas, incluyendo enlaces a involucrina. Esta omegahidroxiceramida unida covalentemente forma una monocapa lipídica que rodea la superficie exterior de las células cornificadas. El papel preciso de esta estructura es desconocido. Recientemente se demostró la importancia de omegahidroxiceramidas sobre la función de barrera

mediante la inhibición de su formación en la piel de ratón sin pelo con un inhibidor de la CYP4 P-450 omega hidroxilasa (Behne et al., J. Invest. Dermatol, 114 (1): 185-92 (2000)).

5 **[0082]** Después del descubrimiento de que el tetróxido de rutenio podría utilizarse para revelar las lamelas en el microscopio electrónico, el análisis de la ultraestructura del estrato córneo ha proporcionado importantes conocimientos sobre la calidad del estrato córneo. Por ejemplo, los estudios han examinado la presencia de cuerpos lamelares en el estrato granuloso, la excreción adecuada del contenido de cuerpos lamelares en la interfase estrato granuloso/estrato córneo y la presencia de bandas alternadas densas de electrones y luminosas de electrones de las lamelas lipídicas. La microscopía electrónica revela también desmosomas densos de electrones en el estrato
10 córneo, ocupando el ~15% de los espacios intercelulares y que posiblemente son importantes en la adhesión célula-célula.

15 **[0083]** La presente solicitud proporciona sustitutos de piel que tienen una función de barrera mejorada, y describe composiciones y métodos para la fabricación de sustitutos de piel que tienen una función de barrera mejorada. Por conveniencia, la descripción de la invención se presenta en las siguientes secciones: a) Fuentes de queratinocitos y otras células para crear sustitutos de piel con una función de barrera mejorada; B) Condiciones de cultivo para crear una función de barrera mejorada en sustitutos de piel; C) Modificación genética de células para una función de barrera mejorada; y D) Usos de los sustitutos de piel que tienen una función de barrera mejorada.

20 **A. Fuentes de queratinocitos y otras células para crear sustitutos de piel**

25 **[0084]** Se contempla que los métodos de la presente solicitud se pueden utilizar para crear sustitutos de piel que tienen una función de barrera mejorada. En general, cualquier fuente de células o línea celular que pueda estratificarse en epitelio escamoso es útil en la presente solicitud. Por consiguiente, la presente solicitud no se limita al uso de cualquier fuente particular de células que son capaces de diferenciarse en el epitelio escamoso. De hecho, la presente solicitud contempla el uso de una variedad de líneas celulares y fuentes de células que se pueden diferenciar en el epitelio escamoso, incluyendo queratinocitos primarios e inmortalizados. Fuentes de células incluyen queratinocitos y fibroblastos dérmicos de biopsias de donantes humanos y cadáveres (Auger et al., In Vitro Cell. Dev. Biol. -Animal 36:96-103; patentes de Estados Unidos Nos. 5,968,546 y 5,693,332), prepuccios neonatales (Asbill et al., Pharm. Research 17(9): 1092-97 (2000); Meana et al., Burns 24:621-30 (1998); patentes de Estados Unidos Nos. 4,485,096; 6,039,760; y 5,536,656), y líneas celulares de queratinocitos inmortalizados, tales como células NM1 (Baden, In Vitro Cell. Dev. Biol. 23(3):205-213 (1987)), células HaCaT (Boucamp et al., J. cell. Boil. 106:761-771 (1988)); y células NIKS (línea celular BC-1-Ep/SL; patente de Estados Unidos No. 5,989,837 ATCC CRL-12191). Cada una de estas líneas celulares se puede cultivar o modificar genéticamente modificada tal como
35 se describe a continuación a efectos de mejorar la función de barrera del equivalente de piel resultante.

40 **[0085]** En realizaciones particularmente preferidas, se utilizan células NIKS. El descubrimiento de una nueva línea celular de queratinocitos humanos (queratinocitos inmortalizados o NIKS casi diploides) ofrece una oportunidad para modificar genéticamente queratinocitos humanos para nuevos métodos de ensayo in vitro. Una ventaja única de las células NIKS es que son una fuente constante de queratinocitos humanos genéticamente uniformes, libres de patógenos. Por esta razón, son útiles para la aplicación de estrategias de modificación genética y expresión génica genómica para proporcionar cultivos de equivalentes de piel con propiedades más similares a la piel humana. Dichos sistemas proporcionarán una importante alternativa al uso de animales para probar los compuestos y formulaciones. La línea celular de queratinocitos NIKS, identificada y caracterizada en la Universidad de Wisconsin, no es tumorigénica, muestra un cariotipo estable, y muestra una diferenciación normal tanto en cultivo en monocapa como en cultivo organotípico. Las células NIKS forman equivalentes de piel totalmente estratificadas en cultivo. Estos cultivos son indistinguibles por todos los criterios examinados hasta ahora de cultivos organotípicos formados de queratinocitos humanos primarios. A diferencia de células primarias, sin embargo, las células inmortalizadas NIKS continuarán proliferando en cultivo en monocapa indefinidamente. Esto proporciona una oportunidad para manipular genéticamente las células y aislar nuevos clones de células con nuevas propiedades útiles (Allen-Hoffmann et al., J. Invest. Dermatol, 114 (3): 444-455 (2000))

55 **[0086]** Las células NIKS surgieron de la cepa BC-1-Ep de los queratinocitos de prepucio neonatal humano aislados de un bebé varón aparentemente normal. En los primeros pases, las células BC-1-Ep no mostraron características morfológicas o de crecimiento que fueran atípicas para queratinocitos humanos normales cultivados. Las células BC-1-Ep cultivadas mostraron estratificación, así como características de muerte celular programada. Para determinar la vida útil de replicación, las células BC-1-Ep se cultivaron en serie hasta la senescencia en un medio de crecimiento de queratinocitos estándar a una densidad de 3×10^5 células por placa de 100 mm y se hicieron pases a intervalos semanales (aproximadamente una separación de 1:25). Por el pase 15, la mayoría de los queratinocitos en la población parecían senescentes en base a la presencia de numerosas colonias abortivas que presentaban células grandes y planas. Sin embargo, en el pase 16, los queratinocitos que presentaban un tamaño de células pequeñas eran evidentes. Por el pase 17, sólo los queratinocitos de tamaño pequeño estaban presentes en el cultivo y no eran evidentes los queratinocitos senescentes grandes. La población resultante de pequeños queratinocitos que sobrevivieron este posible periodo de crisis aparecieron morfológicamente uniformes y produjeron colonias de queratinocitos que mostraban características típicas de queratinocitos, incluyendo la adhesión célula-célula y la producción aparente de escamas. Los queratinocitos que sobrevivieron a la senescencia se cultivaron en serie a una
65

densidad de 3×10^5 células por placa de 100 mm. Normalmente los cultivos alcanzaron una densidad celular de aproximadamente 8×10^6 células en 7 días. Esta velocidad estable de crecimiento celular se mantuvo a través de por lo menos 59 pases, lo que demuestra que las células habían alcanzado la inmortalidad. Los queratinocitos que surgieron de la población senescente original fueron designados originalmente como línea espontánea/BC-1-Ep y ahora se denominan NIKS. La línea celular NIKS ha sido cribada por la presencia de secuencias de ADN proviral para VIH-1, VIH-2, EBV, CMV, HTLV-1, HTLV-2, VHB, VHC, parvovirus B-19, VPH-16 y VPH-31 utilizando PCR o análisis Southern. No se detectó ninguno de estos virus.

[0087] El análisis cromosómico se realizó en las células BC-1-Ep parentales en el pase 3 y las células NIKS en los pases 31 y 54. Las células BC-1-Ep parentales tienen un complemento cromosómico normal de 46, XY. En el pase 31, todas las células NIKS contienen 47 cromosomas con un isocromosoma adicional del brazo largo del cromosoma 8. No se detectaron otras anomalías cromosómicas generales o cromosomas marcadores. En el pase 54, todas las células contenían el isocromosoma 8.

[0088] Las huellas genéticas de ADN para la línea celular NIKS y los queratinocitos BC-1-EP son idénticas en los doce locus analizados, lo que demuestra que las células NIKS surgieron de la población de BC-1-Ep parental. Las probabilidades de que la línea celular NIKS tenga la huella genética de ADN de BC-1-Ep parental por azar es de 4×10^{-16} . Las huellas genéticas de ADN de tres fuentes diferentes de queratinocitos humanos, ED-1-Ep, SCC4 y SCC13y son diferentes del patrón de BC-1-EP. Estos datos también muestran que los queratinocitos aislados de otros seres humanos, ED-1-Ep, SCC4 y SCC13y, no están relacionados con las células BC-1-Ep o entre sí. Los datos de huellas genéticas de ADN de NIKS proporcionan una manera inequívoca para identificar la línea celular NIKS.

[0089] La pérdida de función de p53 está asociada con un potencial proliferativo aumentado y un aumento de la frecuencia de inmortalidad en células cultivadas. La secuencia de p53 en las células NIKS es idéntica a las secuencias publicadas de p53 (número de acceso al GenBank: M14695). En los seres humanos, existe p53 en dos formas polimórficas predominantes que se distinguen por el aminoácido en el codón 72. Ambos alelos de p53 en las células NIKS son de tipo natural y tienen la secuencia CGC en el codón 72, que codifica una arginina. La otra forma común de p53 tiene una prolina en esta posición. La secuencia completa de p53 en las células NIKS es idéntica a las células progenitoras BC-L-EP. Rb también se encontró que era de tipo natural en las células NIKS.

[0090] El crecimiento independiente del anclaje está muy correlacionado con la tumorigenicidad in vivo. Por esta razón, se investigaron las características de crecimiento independiente del anclaje de células NIKS en un medio que contiene agar o metilcelulosa. Después de 4 semanas en un medio que contenía agar o metilcelulosa, las células NIKS permanecieron como células individuales. Los ensayos continuaron durante un total de 8 semanas para detectar variantes de crecimiento lento de las células NIKS. No se observó ninguna.

[0091] Para determinar la tumorigenicidad de los queratinocitos BC-1-EP parentales y la línea celular inmortal de queratinocitos NIKS, se inyectaron las células en los costados de ratones desnudos atímicos. La línea celular de carcinoma de células escamosas humanas, SCC4, se utilizó como control positivo para la producción de tumores en estos animales. La inyección de las muestras se diseñó de manera que los animales recibieron células SCC4 en un costado y, los queratinocitos BC-1-EP parentales o las células NIKS en el costado opuesto. Esta estrategia de inyección eliminó la variación entre animales en la producción de tumores y confirmó que los ratones podrían apoyar el crecimiento vigoroso de células tumorigénicas. Ni los queratinocitos BC-1-EP parentales (paso 6) ni los queratinocitos NIKS (paso 35) produjeron tumores en ratones desnudos atímicos.

[0092] Se analizaron células NIKS por la capacidad de experimentar diferenciación en el cultivo de superficie y el cultivo organotípico. Para las células en cultivo de superficie, se monitorizó un marcador de diferenciación escamosa, la formación de envolturas cornificadas. En queratinocitos humanos cultivados, las primeras etapas de ensamblaje de envolturas cornificadas dan lugar a la formación de una estructura inmadura compuesta de involucrina, cistatina- α y otras proteínas, que representan la tercera más interna de las envolturas cornificadas maduras. Menos del 2% de los queratinocitos de las células BC-1-EP adherentes o la línea celular NIKS producen envolturas cornificadas. Este hallazgo es consistente con estudios previos que demuestran que queratinocitos subconfluentes de crecimiento activo producen menos del 5% de envolturas cornificadas. Para determinar si la línea celular NIKS es capaz de producir envolturas cornificadas cuando se induce la diferenciación, se extrajeron las células del cultivo de superficie y se suspendieron durante 24 horas en un medio hecho semisólido con metilcelulosa. Muchos aspectos de la diferenciación terminal, incluyendo la expresión diferencial de las queratinas y la formación de envolturas cornificadas, se pueden activar in vitro mediante la pérdida de queratinocitos célula-célula y la adhesión célula-sustrato. Los queratinocitos NIKS produjeron tantas envolturas cornificadas, y normalmente más, que los queratinocitos parentales. Estos hallazgos demuestran que los queratinocitos NIKS no son defectuosos en su capacidad para iniciar la formación de esta estructura de diferenciación específica del tipo de célula.

[0093] Para confirmar que los queratinocitos NIKS pueden experimentar una diferenciación escamosa, las células se cultivaron en cultivo organotípico. Los cultivos de queratinocitos desarrollados en sustratos de plástico y sumergidos en un medio se replican, pero muestran una diferenciación limitada. Específicamente, los queratinocitos humanos se vuelven confluentes y se someten a una estratificación limitada que produce una lámina que consiste en 3 o más

capas de queratinocitos. Mediante microscopía óptica y electrónica existen diferencias notables entre la arquitectura de las láminas de múltiples capas formadas en el cultivo de tejido y la piel humana intacta. En cambio, las técnicas de cultivo organotípico permiten el crecimiento y diferenciación de queratinocitos en condiciones similares a in vivo. Específicamente, las células se adhieren a un sustrato fisiológico que consiste en fibroblastos dérmicos incluidos dentro de una base de colágeno fibrilar. El cultivo organotípico se mantiene en la interfase de medio aire. De esta manera, las células en las láminas superiores se exponen al aire, mientras las células basales de proliferación permanecen más cercanas al gradiente de nutrientes proporcionados por difusión a través del gel de colágeno. En estas condiciones, se forma una arquitectura normal del tejido correcta. Son evidentes varias características de una epidermis normal diferenciadora. En las células parentales y la línea celular NIKS una sola capa de células basales cuboidales descansa en la unión de la epidermis y el equivalente dérmico. La morfología redondeada y la proporción elevada de núcleo con respecto a citoplasma es indicativo de una población de queratinocitos que se dividen activamente. En la epidermis humana normal, a medida que las células basales se dividen dan lugar a células hijas que migran hacia arriba en las capas diferenciadoras del tejido. Las células hijas aumentan de tamaño y se vuelven aplanadas y escamosas. Finalmente, estas células pierden el núcleo y forman estructuras queratinizadas cornificadas. Este proceso de diferenciación normal es evidente en las capas superiores de las células parentales y las células NIKS. La aparición de células escamosas aplanadas es evidente en las capas superiores de los queratinocitos y demuestra que la estratificación ha tenido lugar en los cultivos organotípicos. En la parte más superior de los cultivos organotípicos, las escamas sin núcleo se pierden de la parte superior del cultivo. Hasta la fecha, no se han observado diferencias histológicas en la diferenciación a nivel de microscopio óptico entre los queratinocitos parentales y la línea celular de queratinocitos NIKS desarrollada en el cultivo organotípico.

[0094] Para observar características más detalladas de los cultivos organotípicos parentales (pase 5) y NIKS (pase 38) y para confirmar las observaciones histológicas, se analizaron las muestras utilizando microscopía electrónica. Las células parentales y la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados, NIKS, se recogieron después de 15 días en cultivo organotípico y se hizo un corte perpendicular a la capa basal para mostrar la extensión de la estratificación. Tanto las células parentales como la línea celular NIKS experimentan una gran estratificación en cultivo organotípico y forman estructuras que son características de la epidermis humana normal. Se forman abundantes desmosomas en cultivos organotípicos de células parentales y la línea celular NIKS. También se observó la formación de una lámina basal y los hemidesmosomas asociados en las capas de queratinocitos basales de las células parentales y la línea celular. Los hemidesmosomas son estructuras especializadas que incrementan la adhesión de los queratinocitos a la lámina basal y ayudan a mantener la integridad y la resistencia del tejido. La presencia de estas estructuras era especialmente evidente en áreas en las que las células parentales o las células NIKS se han unido directamente al soporte poroso. Estos descubrimientos concuerdan con los descubrimientos ultraestructurales previos que utilizan queratinocitos de prepucio humano cultivados sobre un soporte poroso que contiene fibroblastos. El análisis a nivel de microscopio óptico y de electrones demuestra que la línea celular NIKS en un cultivo organotípico puede estratificarse, diferenciarse y formar estructuras, tales como desmosomas, lámina basal y hemidesmosomas hallados en epidermis humana normal.

B. Condiciones de cultivo para crear una función de barrera mejorada en sustitutos de piel

[0095] En algunas realizaciones de la presente solicitud, se proporcionan métodos de cultivo de equivalentes de piel que dan lugar a la función de barrera mejorada en comparación con los equivalentes de piel cultivados mediante métodos convencionales. La estratificación completa y la diferenciación histológica de los queratinocitos normales se pueden lograr mediante el uso de métodos de cultivos organotípicos tridimensionales (Bell et al., Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU., 76: 1274-1278 (1979); Fusenig, Epithelial mesenchymal interactions regulate queratinocito growth and differentiation in vitro, in The Queratinocito Handbook, I.M. Leigh, Lane, E.B., y F.M. Watt, Editor. 1994, University Press: Cambridge (1994); Parenteau et al., Cytotechnology, 9: 163-171(1992)). Los queratinocitos normales desarrollados en la superficie de geles de colágeno que contienen fibroblastos dérmicos pueden generar estructuras especializadas, tales como la membrana basal y los hemidesmosomas, que son característicos de la arquitectura del tejido normal de epitelios escamosos estratificados. La técnica de cultivo organotípico para queratinocitos normales ha impulsado el reciente desarrollo de modelos in vitro para estudios farmacotológicos cutáneos. Esto se ha convertido en una importante alternativa a la experimentación con animales

[0096] Cuando los cultivos in vitro de queratinocitos humanos se desarrollan en una interfase aire-líquido, se forma un estrato córneo muy ordenado. Aunque la permeabilidad en agua disminuye con el aumento del tiempo de cultivo en la interfase aire-líquido (Cumpstone et al., J. Invest. Dermatol., 92 (4): 598-600 (1989)), la permeabilidad de los cultivos de equivalente de piel in vitro es mucho mayor que la de la piel humana intacta, es decir, la función de barrera es defectuosa en los sistemas de cultivo Ponoc, int. J. Cosmetic Sci., 14: 245-264 (1992)). En un esfuerzo por mejorar la barrera de permeabilidad, se han examinado un conjunto de variables de cultivo y algunos han conducido a propiedades mejoradas de los cultivos (Tabla 1). Por ejemplo, el crecimiento de los cultivos a una humedad relativa baja mejora la función de barrera de cultivos de equivalentes de piel (Mak et al., J. Invest. Dermatol., 96 (3): 323-7 (1991)). Se cree que el flujo de agua transepidérmica puede servir como una señal reguladora para la síntesis de lípidos de la epidermis y la reparación después de la alteración de la barrera epidérmica (Grubauer et al., J. Lipid Res., 30 (3): 323-33 (1989)). También se han utilizado ratones sin pelo para demostrar la función de barrera mejorada, la morfología epidérmica (grosor de SC, número de estructuras de membranas lamelares, número de cuerpos lamelares) y el contenido de lípidos en respuesta a la menor humedad.

[0097] Una diferencia bioquímica clave entre sustitutos de piel cultivados y la piel intacta es el perfil de lípidos extracelulares que se hallan en la capa más externa de la piel normal. Los cultivos de queratinocitos diferenciados son deficientes en varias ceramidas que son constituyentes principales de piel normal (Ponec et al., J. Invest. Dermatol., 109(3): 348-55 (1997)). Se secretan grandes cantidades de estos lípidos extracelulares especializados por queratinocitos diferenciados y se ensamblan en bicapas lipídicas que son esenciales para la función de barrera epidérmica normal. La comparación de la composición lipídica entre los cultivos de equivalentes de piel in vitro y la piel humana reveló diferencias sorprendentes. La piel humana contiene siete formas de ceramidas, pero los cultivos producían principalmente las ceramidas 1-3 y muy poco de las ceramidas 6 y 7. El reestablecimiento de un perfil de lípidos más completo ha sido el objetivo final de varios estudios. Por ejemplo, se observó que la adición de vitamina C al medio era crítica para un espectro completo de lípidos ceramidas en cultivos de equivalente de piel. Las ceramidas 6 y 7 contienen una base esfingoide hidroxilada y/o ácido graso, y la producción de éstas se facilita probablemente por la presencia de vitamina C. En este estudio, los perfiles de lípidos de los cultivos de equivalente de piel disponibles comercialmente EPIDERM, SKINETHIC y Living Skin Equivalent eran todos deficientes en las ceramidas 5, 6 y 7. La adición de vitamina C mejoró el perfil de lípidos y la arquitectura global de SC determinada mediante microscopía electrónica.

Tabla 1. Efecto de las sustancias añadidas a cultivos in vitro sobre la función de barrera o la composición lipídica

Compuesto	Función de barrera	Composición lipídica	Referencia
EGF		Triglicéridos elevados	Ponec et al., supra.
Estrógeno	Acelera		Williams et al., J Investig. Dermatol. Symp. Proc., 3(2): 75-9 (1998).
Activadores de FXAR	Acelera		Hanley et al., supra.
Activadores de PPAR	Acelera		Hanley et al.
Vitamina C		Mejora importante	Ponec et al.
Vitamina E		Sin efecto	Ponec et al.
Vitamina D	Mejorada/Sin efecto		Williams et al., Mac et al., supra.

[0098] Los activadores de los receptores nucleares de hormonas han sido analizados por sus efectos sobre el desarrollo de la función de barrera. La adición de vitamina D ha dado lugar a mejoras en algunos estudios (Mak et al., Supra), pero no en otros (Hanley et al., Supra). Los activadores del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR) y el receptor activado por farnesoide X (FXAR) aceleran la maduración de barrera en la piel de rata fetal in vitro y en el útero. Los cambios estructurales fueron consistentes con la reducción en la pérdida de agua transepidérmica, incluyendo la aparición de una SC distinta, un estrato granuloso más grueso, y un aumento de la densidad de las estructuras lamelares.

[0099] La composición lipídica anormal de cultivos de equivalentes de piel también se mejora mediante el injerto sobre ratones inmunodeficientes (Vicanova et al., J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 3(2): 114-20 (1998)). Los queratinocitos humanos cultivados mantienen la capacidad de generar una epidermis diferenciada cuando se injertan en ratones atímicos. Cuando se examinaron los sustitutos de piel cultivados entre seis meses y dos años después del injerto, se observaron mejoras significativas en la composición lipídica y la ultraestructura de SC. Los niveles elevados de triglicéridos y los niveles bajos de ésteres de colesterol y ácidos grasos libres observados en los cultivos in vitro se normalizaron en seis meses después del injerto. Se expresaron las ceramidas 6 y 7, indetectables en los cultivos in vitro, por células humanas después de seis meses de injerto. Estos estudios destacan el hecho de que las condiciones de cultivo in vitro actuales son defectuosas en su capacidad de producir equivalentes de piel con una función de barrera normal. Las condiciones de cultivo mejoradas que más mimetizan estrechamente las señales normales de desarrollo deben aumentar el desarrollo de la función de barrera.

[0100] El desarrollo de la función de barrera in vivo está regulada temporalmente. En la rata, por ejemplo, en el día gestacional 19 las crías de ratas fetales no presentan barrera, pero antes del día 21 se ha formado una barrera competente (Aszterbaum et al., Pediatr. Res., 31 (4 Pt 1): 308-17. (1992)). El desarrollo de una barrera epidérmica competente se produce entre los días embrionarios 15 y 16 de la gestación de ratón (Hardman et al, Desarrollo, 125: 1541-1552 (1998)). La barrera funcional aparece junto con una SC de varias capas y membranas lamelares maduras en SC. La expresión de las proteínas estructurales de corneocitos loricina, filagrina e involucrina aumentan durante este período. La expresión de las enzimas implicadas en el procesamiento de lípidos, beta-glucocerebrosidasa y sulfatasa de esteroides, también aumentan. El proceso también es susceptible a la manipulación por los factores ambientales y hormonales. Los activadores PPAR y FXAR proporcionadas durante dos días por el útero aceleraron el desarrollo de la función de barrera en crías de 19 días tal como se observó mediante la reducción en la pérdida de agua transepidérmica. Los tratamientos también mejoraron la morfología de SC y la expresión de genes de las proteínas estructurales y funciones enzimáticas clave.

[0101] Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente solicitud, los siguientes tratamientos, solos o en combinación, se utilizan para proporcionar una función de barrera incrementada en equivalentes de piel cultivadas organotípicamente. En algunas realizaciones, los cultivos organotípicos se complementan con de aproximadamente 1 microgramo/ml a aproximadamente 200 microgramos/ml de ácido ascórbico, preferiblemente aproximadamente 50 microgramos/ml de ácido ascórbico. En otras realizaciones, los cultivos organotípicos se complementan con aproximadamente de 1 a 200 μM de ácido linoleico, preferiblemente aproximadamente 30 μM de ácido linoleico. En otras realizaciones, los cultivos organotípicos se complementan con aproximadamente de 1 a 200 μM de farnesol, preferiblemente aproximadamente 50 μM de farnesol. En otras realizaciones, los cultivos organotípicos se llevan a cabo a de aproximadamente 50 al 95% de humedad, preferiblemente aproximadamente el 75% de humedad. La función de barrera se evalúa convenientemente en los equivalentes de piel mediante la medición de la capacitancia eléctrica de la superficie (SEC). En realizaciones preferidas, los equivalentes de piel con una función de barrera mejorada en comparación con los equivalentes de piel de control tienen un valor SEC de menos de aproximadamente 5 veces la SEC observada en la piel humana normal (por ejemplo, aproximadamente 150-250 pF). En realizaciones particularmente preferidas, los equivalentes de piel con una función de barrera mejorada en comparación con los equivalentes de piel de control tienen una SEC de menos de aproximadamente de 2-3 veces de la SEC observada en la piel humana normal (por ejemplo, aproximadamente 80-120 pF). En otras realizaciones, los equivalentes de piel con la función de barrera mejorada se caracterizan por el contenido de ceramida. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el contenido de ceramidas 5-7 es de entre aproximadamente 20-50% de la masa total de ceramida, preferiblemente aproximadamente 30-45% de la masa total de la ceramida. En otras realizaciones, el contenido de ceramida 2 es de entre aproximadamente 10 al 40% de la masa total de ceramida, preferiblemente de aproximadamente 20 al 30% del contenido total de ceramida.

[0102] La presente solicitud proporciona además métodos y composiciones adicionales para producir equivalentes de piel con características mejoradas, incluyendo una función de barrera mejorada. Los métodos y composiciones mejorados se describen en las siguientes secciones: 1) Técnicas de cultivo y 2) Medios de cultivo.

1. Técnicas de cultivo

[0103] La presente solicitud proporciona técnicas mejoradas de cultivos organotípicos para producir equivalentes de piel con propiedades superiores. En algunas realizaciones, se prepara un equivalente dérmico. En realizaciones preferidas, el equivalente dérmico comprende colágeno y fibroblastos humanos. Se contempla el uso de una variedad de tipos de colágeno, incluyendo, pero sin limitación, colágeno de tendón de cola de rata (Tipo I). Asimismo, se contempla el uso de una variedad de diferentes tipos de fibroblastos, incluyendo, pero sin limitación, células NHDF (Fibroblastos Dérmicos Humanos Normales) y células recogidas de un donante o paciente.

[0104] La presente solicitud tampoco se limita a la utilización de ninguna concentración o cantidad de colágeno particular. En realizaciones preferidas, los equivalentes dérmicos se preparan con aproximadamente 0,2 mg de colágeno por centímetro cuadrado de dicho equivalente dérmico hasta 2,0 mg de colágeno por centímetro cuadrado de dicho equivalente dérmico. En realizaciones más preferidas, el equivalente dérmico contiene aproximadamente 0,22 mg de colágeno por centímetro cuadrado de dicho equivalente dérmico hasta 1,0 mg de colágeno por centímetro cuadrado de dicho equivalente dérmico. En las realizaciones más preferidas, el equivalente dérmico contiene aproximadamente 0,5 mg de colágeno por centímetro cuadrado de dicho equivalente dérmico.

[0105] A diferencia de los métodos más descritos previamente para el cultivo organotípico de piel, se aplica una mezcla de colágeno y fibroblastos directamente a cualquier dispositivo de cultivo que se utilice. Los solicitantes han descubierto que la presencia de una primera capa acelular no es necesaria para obtener una buena contracción y una adherencia al dispositivo de cultivo. En algunas realizaciones, se incluyen fibroblastos en una concentración final de aproximadamente 10.000 células/ml a aproximadamente 100.000 células/ml, preferiblemente aproximadamente 50.000 células/ml.

[0106] Se utilizan un conjunto de dispositivos de cultivo en la presente solicitud. Los dispositivos de cultivo preferidos (véase la figura 4) son cámaras de crecimiento comprendidas de una pared lateral y una superficie de base. En algunas realizaciones preferidas, la cámara de crecimiento tiene en general forma de copa. En realizaciones preferidas, la superficie base es permeable al medio de cultivo. Un ejemplo no limitante de un material de superficie permeable adecuado es policarbonato poroso. La presente solicitud es compatible con dispositivos de cultivo disponibles comercialmente, incluyendo insertos de cultivo MILLICELL (MILLIPORE) y TRANSWELL (CORNING). Los insertos MILLICELL son especialmente útiles para la preparación de equivalentes de piel utilizados para fines de prueba (por ejemplo, equivalentes de piel de aproximadamente 1 cm de diámetro). Los inventores han descubierto que se pueden incubar un conjunto de insertos de tamaño MILLICELL en una placa de petri más grande (es decir, una placa de cultivo de 100 mm). Los insertos TRANSWELL son útiles para la producción de equivalentes de piel más grandes (por ejemplo, aproximadamente 10 cm de diámetro). Estos equivalentes de piel más grandes se pueden utilizar como injertos, para pruebas a mayor escala, o diseccionarse en formatos de prueba más pequeños.

[0107] En realizaciones preferidas, los equivalentes dérmicos recién vertidos se sumergen en medio de cultivo y se cultivan hasta que tenga lugar la contracción del equivalente dérmico. Esto crea un equivalente dérmico con una apariencia generalmente cóncava. En métodos descritos previamente, después de la contracción de la capa

dérmica, la capa dérmica se siembra con queratinocitos y a continuación se resurge. A continuación, el cultivo organotípico se levanta a la interfase de aire del medio de cultivo después de aproximadamente 4-7 días. A diferencia de los métodos descritos previamente, los presentes inventores han descubierto que es preferible levantar el equivalente dérmico a la interfase con aire antes de sembrarse con queratinocitos. A continuación, el cultivo se mantiene preferiblemente en la interfase de aire a medida que tiene lugar la estratificación. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el equivalente dérmico se levanta preferiblemente a la interfase con aire y se mantiene durante más de aproximadamente de 6 horas antes de sembrarse. En realizaciones más preferidas, el equivalente dérmico se levanta preferiblemente a la interfase de aire y se mantiene durante más de aproximadamente doce horas antes de sembrarse. En las realizaciones más preferidas, el equivalente dérmico se levanta preferiblemente a la interfase de aire y se mantiene durante más de aproximadamente veinticuatro antes de sembrarse. En algunas realizaciones, el equivalente dérmico se mantiene durante más de 24 horas en la interfase de aire para proporcionar un equivalente dérmico prefabricado para un uso posterior.

[0108] Las técnicas de cultivo de la presente solicitud proporcionan equivalentes de piel con propiedades superiores. En realizaciones preferidas, los equivalentes de piel tienen una función de barrera mejorada en comparación con equivalentes de piel descritos previamente. En realizaciones más preferidas, la presente solicitud proporciona equivalentes dérmicos para utilizar en la producción de equivalentes de piel con propiedades superiores. En algunas realizaciones, los equivalentes dérmicos se caracterizan por contener mayores concentraciones de colágeno tal como se describe anteriormente.

[0109] En realizaciones más preferidas, la presente invención proporciona composiciones para utilizar en la producción de equivalentes de piel. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden una cámara de crecimiento que tiene una superficie de base y una pared lateral. En realizaciones adicionales, la cámara de crecimiento incluye un equivalente dérmico adyacente a la superficie de base. En realizaciones adicionales, el equivalente dérmico está sustancialmente adherido a la pared lateral.

[0110] Los inventores han descubierto también que la densidad de sembrado de los queratinocitos en los equivalentes dérmicos puede afectar a la calidad del equivalente de piel resultante. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la presente solicitud, la densidad de sembrado se incrementa en aproximadamente un orden de magnitud sobre los métodos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, la densidad de sembrado de queratinocitos varía de aproximadamente 1×10^5 a 1×10^6 células/cm² de equivalente dérmico. En realizaciones más preferidas, la densidad de sembrado de queratinocitos es de aproximadamente $4,65 \times 10^5$ células/cm² de equivalente dérmico.

[0111] La función de barrera se evalúa convenientemente en los equivalentes de piel mediante la medición de la capacitancia eléctrica de la superficie (SEC). En realizaciones preferidas, los equivalentes de piel con una función de barrera mejorada en comparación con los equivalentes de piel de control tienen un valor SEC de menos de aproximadamente 5 veces la SEC observada en la piel humana normal (por ejemplo, aproximadamente 150-250 pF). En realizaciones particularmente preferidas, los equivalentes de piel con una función de barrera mejorada en comparación con los equivalentes de piel de control tienen una SEC de menos de aproximadamente 2-3 veces la SEC observada en la piel humana normal (por ejemplo, aproximadamente 80-120 pF). En otras realizaciones, los equivalentes de piel con función de barrera mejorada se caracterizan por el contenido de ceramida. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el contenido de ceramidas 5-7 es de entre aproximadamente 20-50% de la masa total de ceramida, preferiblemente aproximadamente 30-45% de la masa total de ceramida. En otras realizaciones, el contenido de ceramida 2 es entre aproximadamente 10 a 40% de la masa total de ceramida, preferiblemente de aproximadamente 20 a 30% del contenido total de ceramida.

2. Medios de cultivo

[0112] La presente solicitud proporciona medios de cultivo organotípicos mejorados para la producción de equivalentes de piel con propiedades superiores. En algunas realizaciones, los medios de cultivo de la presente solicitud son medio F12 de Ham y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). En algunas realizaciones, F12 de Ham y DMEM se complementan con por lo menos uno de los siguientes complementos: albúmina de suero bovino, isoproterenol, carnitina, serina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, α -tocoferol, ácido ascórbico, y factor de crecimiento epidérmico (EGF). En otras realizaciones, por lo menos uno de albúmina de suero bovino, isoproterenol, carnitina, serina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, α -tocoferol, ácido ascórbico, y EGF se proporciona en la concentración suficiente para mejorar la función de barrera en equivalentes de piel cultivadas in vitro. En otras realizaciones, el medio comprende un complemento de suero, preferiblemente Clon Fetal II. En algunas realizaciones, el medio comprende además por lo menos uno de los siguientes complementos: hidrocortisona, la toxina del cólera, la insulina, adenina, y CaCl₂. En realizaciones preferidas, la albúmina de suero bovino se proporciona a una concentración de aproximadamente de 0,1 mg/ml hasta 20 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/ml, el isoproterenol se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,1-10,0 μ M, la carnitina se proporciona a una concentración de aproximadamente 1,0 a 100,0 μ M, la serina se proporciona a una concentración de aproximadamente 1,0 a 100,0 μ M, el ácido oleico se proporciona a una concentración de aproximadamente 1,0-100,0 μ M, el ácido linoleico se proporciona a una concentración de aproximadamente 1,0 a

100,0 μ M, el ácido araquidónico se proporciona a una concentración de aproximadamente de 1,0-100,0 μ M, el α -tocoferol se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,1-10,0 μ M, el ácido ascórbico se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,005 a 5,0 mg/ml, y el factor de crecimiento epidérmico se proporciona a una concentración de aproximadamente 0,1-10,0 ng/ml.

5

C. Modificación genética de células para una función de barrera mejorada

[0113] La presente solicitud también contempla que la función de barrera se puede mejorar mediante la expresión de GSKLF heterólogo en las células descritas en la Sección A. La expresión de GSKLF heterólogo también se puede combinar con las condiciones de cultivo mejoradas descritas en la Sección B. Las etapas finales de la diferenciación epidérmica están precedidas por aumento de la expresión de numerosos genes que codifican las enzimas requeridas para las modificaciones bioquímicas que dan lugar al estrato córneo. Además, las condiciones de cultivo que estimulan la diferenciación de los queratinocitos o la alteración experimental de la función barrera de la piel da lugar al aumento de expresión de las enzimas implicadas en la síntesis y metabolismo extracelular de lípidos. Estos cambios de expresión génica indican que uno o más factores de transcripción reguladores son responsables de alterar el perfil de expresión de génica de diferenciación de queratinocitos para facilitar el desarrollo de la barrera epidérmica. La evolución precisa de la función de barrera de la piel en el desarrollo sugiere un control temporal preciso mediante un interruptor de desarrollo. Se pueden iniciar programas de desarrollo complejas mediante la acción de uno o un pequeño número de factores de transcripción reguladores clave, a veces llamados reguladores principales o genes selectores. Un estudio reciente sobre una mutación knock-out en el factor de transcripción factor 4 de tipo Kruppel (Klf4) puede haber identificado uno de los principales reguladores de la función de barrera de la piel (Segre et al., Nat. Genet, 22 (4):. 356-60 (1999)).

[0114] Los ratones mutantes Klf4 nacen con cifras normales, pero mueren rápidamente (<15 horas) después de su nacimiento, aparentemente por shock hipovolémico a consecuencia de la excesiva pérdida de fluidos por evaporación. Un análisis más detallado demostró que, mientras que los ratones normales desarrollan una función de barrera epidérmica intacta antes del día 17,5 de la gestación, los ratones mutantes Klf4 no consiguen desarrollar esta función de barrera y tienen una epidermis que exhibe una excesiva pérdida de agua transepidérmica. Klf4 se expresa en las capas de diferenciación de la epidermis, las capas espinosas y granulares superiores. A diferencia de los defectos causados en otras líneas de ratones mutantes, la ausencia de Klf4 no da lugar a alteraciones graves de la ultraestructura de la epidermis o en perfiles de lípidos. Esto condujo a la hipótesis de que su función principal se encuentra en la adquisición de la función de barrera. En concordancia con esto, se observaron defectos en el estrato granuloso en los gránulos de queratohialina y el aplanamiento de las células SC. Mediante EM, las lamelas intercelulares eran discontinuas en la piel mutante. El defecto en Klf-4 de la piel mutante no se recuperó mediante el injerto sobre ratones de crianza. Klf4 es un miembro de una familia de factores de transcripción; otros miembros están implicados en eventos de diferenciación específicos de tejido en células eritroides y células T. El análisis de las diferencias en la expresión génica entre ratones de tipo natural y ratones mutantes en Klf4 condujo a la identificación de tres genes que fueron regulados por aumento en la piel mutante, lo que sugiere que Klf4 puede reprimir la expresión de estos genes normalmente. La observación de que la pérdida de Klf4 no tiene otros efectos observables sobre el desarrollo del ratón sugiere que Klf4 funciona principalmente para regular el desarrollo de la barrera de permeabilidad epidérmica. El papel de Klf4 en la adquisición de la función de barrera epidérmica plantea la posibilidad de que la expresión de Klf4 en sustitutos de la piel cultivados podría mejorar las propiedades de barrera de estos cultivos de piel sintéticos.

[0115] Por consiguiente, en algunas realizaciones, los queratinocitos primarios o queratinocitos inmortalizados se transfectan con un vector que codifica un homólogo de GSKLF funcional. Se contempla que cuando estos queratinocitos se cultivan organotípicamente, el equivalente de piel resultante exhibirá una la función de barrera mejorada en comparación con cultivos organotípicos formados a partir de queratinocitos de control no transfectados. En realizaciones preferidas, los equivalentes de piel con función de barrera mejorada en comparación con equivalentes de piel de control tienen un valor SEC de menos de aproximadamente 5 veces el valor SEC observado en piel humana normal (por ejemplo, aproximadamente 150-250 pF). En realizaciones particularmente preferidas, los equivalentes de piel con función de barrera mejorada en comparación con equivalentes de piel de control tienen un valor SEC de menos de aproximadamente 2-3 veces del valor de SEC observado en piel humana normal (por ejemplo, aproximadamente 80-120 pF). En otras realizaciones, los equivalentes de piel con función de barrera mejorada se caracterizan por el contenido de ceramida. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el contenido de ceramidas 5-7 es de aproximadamente 20-50% de la masa total de ceramida, preferiblemente de aproximadamente 30-45% de la masa total de ceramida. En otras realizaciones, el contenido de ceramida 2 es de aproximadamente 10 a 40% de la masa total de ceramida, preferiblemente de aproximadamente 20 a 30% del contenido total de ceramida.

60

[0116] La presente solicitud no se limita a la utilización de cualquier homólogo o variante particular de GSKLF. De hecho, puede utilizarse una gran variedad de variantes de GSKLF siempre y cuando se conserve por lo menos cierta actividad de GSKLF de tipo natural. En particular, se contempla que la GSKLF de ratón (SEC ID N^o: 1) y humana (SEQ ID NO: 2) son útiles en la presente solicitud. Adicionalmente, se contempla que las variantes de GSKLF codificadas por secuencias que se hibridan con las SEQ ID NO: 1 y 2 en condiciones de baja a alta rigurosidad serán útiles en la presente solicitud. Pueden cribarse las variantes funcionales mediante la expresión de la variante en un vector

65

apropiado (descrito en más detalle a continuación) en queratinocitos, utilizando los heratinocitos para producir un equivalente de piel, y el análisis del equivalente de piel para la función de barrera incrementada. Alternativamente, pueden identificarse variantes funcionales mediante un ensayo de cambio de desplazamiento de la movilidad electroforética tal como se describe en Zhang et al., J. Biol. Chem., 273 (28): 17917-25 (1998).

[0117] En algunas realizaciones, las variantes resultantes de mutación (es decir, un cambio en la secuencia de ácido nucleico), en general, producen ARNm o polipéptidos alterados cuya estructura o función puede estar o no alterada. Cualquier gen determinado puede tener ninguna, una o muchas formas variantes. Los cambios mutaciones habituales que dan lugar a variantes se atribuyen en general a deleciones, adiciones o sustituciones de ácidos nucleicos. Cada uno de estos tipos de cambios puede tener lugar solo, o en combinación con los otros, y a una tasa de una o más veces en una secuencia determinada.

[0118] Se contempla que es posible modificar la estructura de un péptido que tiene una función (por ejemplo, función de GKLF) para fines, tales como aumentar la afinidad de unión de GKLF por su ligando de ácido nucleico. Dichos péptidos modificados se consideran equivalentes funcionales de péptidos que tienen una actividad de GKLF tal como se define en este documento. Se puede producir un péptido modificado en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido ha sido alterada, tal como mediante sustitución, deleción, o adición. En realizaciones particularmente preferidas, estas modificaciones no reducen significativamente la actividad de la GKLF modificada. En otras palabras, se puede evaluar la construcción "X" con el fin de determinar si es un miembro del género de la GKLF modificada o variante de la presente solicitud tal como se define funcionalmente, en lugar de estructuralmente. En realizaciones preferidas, la actividad de GKLF variante o mutante se evalúa mediante métodos descritos anteriormente.

[0119] Además, tal como se describió anteriormente, las formas variantes de GKLF también se contemplan como equivalentes a aquellos péptidos y moléculas de ADN que se exponen con más detalle en este documento. Por ejemplo, se contempla que la sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado (es decir, mutaciones conservativas) no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica de la molécula resultante. Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente invención proporcionan variantes de GKLF descritas en el presente documento que contienen sustituciones conservativas. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente pueden dividirse en cuatro familias: (1) ácidos (aspartato, glutamato); (2) básicos (lisina, arginina, histidina); (3) no polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), y (4) polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). La fenilalanina, el triptófano, y la tirosina se clasifican a veces conjuntamente como aminoácidos aromáticos. De forma similar, el repertorio de aminoácidos puede agruparse como (1) ácidos (aspartato, glutamato); (2) básicos (lisina, arginina, histidina), (3) alifáticos (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), con serina y treonina opcionalmente agrupadas por separado como hidroxil-alifático; (4) aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano); (5) amida (asparagina, glutamina), y (6) que contienen azufre (cisteína y metionina) (por ejemplo, Stryer ed., Biochemistry, pág. 17-21, 2ª ed, WH Freeman and Co., 1981). Si un cambio en la secuencia de aminoácidos de un péptido da como resultado un homólogo funcional se puede determinar fácilmente mediante la evaluación de la capacidad del péptido variante para funcionar de una manera similar a la proteína de tipo natural. Los péptidos que tienen más de una sustitución se pueden analizar fácilmente de la misma manera.

[0120] Más raramente, una variante incluye cambios "no conservativos" (por ejemplo, sustitución de una glicina por un triptófano). Las variaciones menores análogas también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácidos, o ambos. Se puede hallar una guía para determinar qué residuos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar o eliminar sin suprimir la actividad biológica utilizando programas informáticos (por ejemplo, software LASERGENE, DNASTAR Inc., Madison, Wis.).

[0121] El GKLF heterólogo se expresa en queratinocitos mediante el uso de un vector adecuado y secuencias reguladoras. En algunas realizaciones preferidas, se utilizan promotores de una involucrina o transglutaminasa 3. En otras realizaciones preferidas, la expresión de GKLF estará dirigida por el sistema de promotores inducibles del plásmido pTetOn (Clontech, Palo Alto, CA). Se contempla que son adecuados un conjunto de otros vectores de expresión de mamíferos para su uso en la presente solicitud, incluyendo, pero sin limitación, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Se puede utilizar cualquier otro plásmido o vector siempre que sean replicables y viables en el huésped. En algunas realizaciones preferidas de la presente solicitud, los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados, y también cualquier sitio de unión a ribosoma necesario, sitios de poliadenilación, sitios donantes y aceptores por corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción, y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. En otras realizaciones, pueden usarse secuencias de ADN derivadas del empalme de SV40 y sitios de poliadenilación para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos. Además, el gen de Klf4 se puede insertar a través de un vector retroviral. En realizaciones particularmente preferidas, el vector retroviral es un vector retroviral pseudotipado (Clontech, Palo Alto, CA). La transfección puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, coprecipitación con fosfato de calcio, electroporación, bombardeo de micropartículas, transfección mediada por liposomas, o infección retroviral.

D. Usos de sustitutos de piel con una función de barrera mejorada

[0122] Se contempla que los sustitutos de piel de la presente invención presentan una variedad de usos. Estos usos incluyen, pero sin limitación, el uso de cribar compuestos (por ejemplo, irritantes, sustratos para cultivar tumores y agentes patológicos (por ejemplo, virus del papiloma humano) y uso para la cicatrización de heridas y el tratamiento de quemaduras. Estos usos se describen con más detalle a continuación.

1. Uso para el cribado de compuestos

[0123] Los equivalentes de piel de la presente invención se pueden utilizar para un conjunto de pruebas in vitro. En particular, los equivalentes de piel son útiles en la evaluación de: productos de cuidado de la piel, metabolismo de fármacos, respuestas celulares a compuestos de prueba, curación de heridas, fototoxicidad, irritación dérmica, inflamación dérmica, corrosividad de la piel y daño celular. Los equivalentes de piel se proporcionan en una variedad de formatos para analizar, incluyendo pero sin limitación, placas de 6 pocillos, 24 pocillos y 96 pocillos. Adicionalmente, los equivalentes de piel se pueden dividir mediante técnicas de disección estándar y a continuación se analizaron. Los equivalentes de piel de la presente invención presentan ambos una capa epidérmica con un estrato córneo diferenciado y una capa dérmica que incluye fibroblastos dérmicos. Tal como se describe anteriormente, en realizaciones particularmente preferidas, la capa dérmica deriva de células NIKS inmortalizadas. Otras líneas celulares preferidas, incluyendo células NIKS, se caracterizan por i) ser inmortalizadas; ii) no ser tumorigénicas; iii) formar envolturas cornificadas cuando se induce la diferenciación; iv) experimentar una diferenciación escamosa normal en cultivos organotípicos; y v) mantener los requisitos de crecimiento específicos del tipo de célula en un cultivo sumergido, en el que dichos requisitos de crecimiento específicos del tipo de células incluyen 1) exhibición de características morfológicas de queratinocitos humanos normales cuando se cultivan en medio de crecimiento de queratinocitos estándar en presencia de células alimentadoras de 3T3 tratadas con mitomicina C; 2) dependencia del factor de crecimiento epidérmico para el cultivo en serie; y 3) inhibición del crecimiento mediante el factor de crecimiento transformante $\beta 1$.

[0124] La presente solicitud comprende una variedad de ensayos de cribado. En algunas realizaciones, el método de cribado comprende proporcionar un equivalente de piel de la presente invención y por lo menos un compuesto o producto de prueba (por ejemplo, un producto de cuidado de la piel, tal como un humectante, cosmético, colorante, o fragancia; los productos pueden estar en cualquier forma, incluyendo, pero sin limitación, cremas, lociones, líquidos y pulverizadores), aplicar el producto o compuesto de prueba al equivalente de piel, y analizar el efecto del producto o compuesto de prueba sobre el equivalente de piel. Se utilizan una amplia variedad de ensayos para determinar el efecto del producto o compuesto de prueba sobre el equivalente de piel. Estos efectos incluyen, pero sin limitación, ensayos de citotoxicidad de MTT (Gay, The Living Skin Equivalent as In Vitro Model for Ranking the Toxic Potential of Dermal Irritants, Toxic. In Vitro (1992)) y ELISA para analizar la liberación de moduladores inflamatorios (por ejemplo, prostaglandina E2, prostaciclina e interleuquina-1-alfa) y quimioattractores. Los ensayos se pueden dirigir adicionalmente a la toxicidad, potencia o eficacia del compuesto o producto. Adicionalmente, se puede analizar el efecto del compuesto o producto en el crecimiento, función de barrera o resistencia del tejido.

[0125] En particular, la presente solicitud contempla el uso de los equivalentes de piel para un cribado de alto rendimiento de compuestos de bibliotecas químicas (por ejemplo, bibliotecas que contienen más de 10^4 compuestos). En algunas realizaciones, las células se utilizan en ensayos de segundos mensajeros que monitorizan la transducción de señal después de la activación de receptores de la superficie celular. En otras realizaciones, las células se pueden utilizar en ensayos de genes informadores que monitorizan las respuestas celulares a nivel de transcripción/traducción. En otras realizaciones, las células se pueden utilizar en ensayos de proliferación celular para monitorizar la respuesta de crecimiento global/no crecimiento de células a los estímulos externos.

[0126] En ensayos con segundos mensajeros, los equivalentes de piel se tratan con un compuesto o conjunto de compuestos (por ejemplo, de una biblioteca combinatoria) y se analizan por la presencia o ausencia de una respuesta a un segundo mensajero. En algunas realizaciones preferidas, las células (es decir, células NIKS) utilizadas para crear los equivalentes de piel se transfectan con un vector de expresión que codifica un receptor de superficie celular recombinante, canal iónico, canal activado por voltaje o alguna otra proteína de interés implicada en una cascada de señalización. Se contempla que por lo menos algunos de los compuestos en la biblioteca combinatoria pueden servir como agonistas, antagonistas, activadores o inhibidores de la proteína o proteínas codificadas por los vectores. También se contempla que por lo menos algunos de los compuestos en la biblioteca combinatoria pueden servir como agonistas, antagonistas, activadores o inhibidores de proteína que actúan cascada arriba o abajo de la proteína codificada por el vector en un mecanismo de transducción de señal.

[0127] En algunas realizaciones, los ensayos con segundos mensajeros miden señales fluorescentes de moléculas informadoras que responden a cambios intracelulares (por ejemplo, concentración de Ca^{2+} , potencial de membrana, pH, IP3, AMPc, liberación de ácido araquidónico) debido a la estimulación de receptores de membrana y canales iónicos (por ejemplo, canales de iones activados por ligandos) (Denyer et al., Drug Discov. Today 3:323-32 (1998); Gonzales et al., Drug. Discov. Today 4:431-39 (1999)). Entre los ejemplos de moléculas informadoras se incluyen, pero sin limitación, sistemas de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (por ejemplo, Cuo-lípidos y

oxonoles, EDAN/DABCYL), indicadores sensibles a calcio (por ejemplo, Fluo-3, FURA 2, INDO 1, y FLUO3/AM, BAPTA AM), indicadores sensibles a cloro (por ejemplo, SPQ, SPA), indicadores sensibles a potasio (por ejemplo, PBF1), indicadores sensibles a sodio (por ejemplo, SBFI), e indicadores sensibles al pH (por ejemplo, BCECF).

5 **[0128]** En general, las células que comprenden los equivalentes de piel se cargan con el indicador antes de la exposición al compuesto. Las respuestas de las células huésped al tratamiento con los compuestos se pueden detectar mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, microscopía de fluorescencia, microscopía confocal, citometría de flujo, dispositivos microfluídicos, sistemas FLIPR (Schroeder y Neagle, J. Biomol. Screening 1:75-80 (1996)), y sistemas de lecturas de placas. En algunas realizaciones preferidas, la respuesta (por ejemplo, incremento en la intensidad fluorescente) causada por el compuesto de actividad desconocida se compara con la respuesta generada por un agonista conocido y se expresa como el porcentaje de la respuesta máxima del agonista conocido. La respuesta máxima causada por un agonista conocido se define como una respuesta del 100%. Asimismo, la respuesta máxima registrada después de la adición de un agonista a una muestra que contiene un antagonista conocido o de prueba es inferior de forma detectable a la respuesta del 100%.

15 **[0129]** Los equivalentes de piel de la presente invención también son útiles en ensayos de genes informadores. Los ensayos de genes informadores implican la utilización de células huésped transfectadas con vectores que codifican un ácido nucleico que comprenden elementos de control de la transcripción de un gen diana (es decir, un gen que controla la expresión y función biológica de una enfermedad diana o respuesta inflamatoria) empalmados a una secuencia codificante de un gen informador. Por lo tanto, la activación del gen diana da lugar a la activación del producto génico informador. Esto sirve como indicador de una respuesta, tal como respuesta inflamatoria. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la construcción génica informadora comprende la región reguladora 5' (por ejemplo, promotores y/o potenciadores) de un gen que se induce debido a la inflamación o irritación de la piel o proteína que está implicada en la síntesis de compuestos producidos en respuesta a la inflamación o irritación (por ejemplo, prostaglandina o prostaciclina) unida operativamente a un gen informador. Entre los ejemplos de genes informadores útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, cloranfenicol transferasa, fosfatasa alcalina, luciferasas de luciérnaga y bacterianas, β -galactosidasa, β -lactamasa, y proteína verde fluorescente. La producción de estas proteínas, con la excepción de la proteína verde, roja, amarilla o azul fluorescente, se detecta a través de la utilización de productos quimioluminiscentes, colorimétricos o bioluminiscentes de sustratos específicos (por ejemplo, X-gal y luciferina). La comparación entre compuestos de actividades conocidas y desconocidas se puede realizar tal como se indica anteriormente.

35 **[0130]** En otras realizaciones preferidas, los equivalentes de piel son útiles para el cribado de la eficacia de la introducción de fármacos a través de la piel o el efecto de los fármacos directamente en la piel. En estas realizaciones, los equivalentes de piel se tratan con el sistema de liberación de fármacos o el fármaco, y se analiza la permeación, penetración o retención o el fármaco en el equivalente de piel. Los métodos para analizar la permeación del fármaco se proporcionan en Asbill et al., Pharm Res. 17(9): 1092-97 (2000). En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se montan en la parte superior de celdas de difusión de Franz modificadas. Los equivalentes de piel se dejan hidratar durante una hora y, a continuación, se pretratan con propilenglicol. A continuación, se añade una suspensión saturada del fármaco modelo en propilenglicol al equivalente de piel. A continuación, se pueden tomar muestras de equivalente de piel a intervalos determinados. Los equivalentes de piel se analizan a continuación mediante HPLC para determinar la concentración del fármaco en la muestra. Los valores de log P para los fármacos se pueden determinar utilizando el programa ACD (Advanced Chemistry Inc., Ontario, Canadá). Estos métodos se pueden adaptar para estudiar la liberación de fármacos a través de parches transdérmicos u otros modos de administración.

45 **[0131]** En realizaciones más preferidas, los equivalentes dérmicos sembrados, que no han experimentado una diferenciación, son útiles en ensayos para compuestos que inhiben, aceleran o, en cualquier caso, realizan la diferenciación de los queratinocitos sembrados.

50 **2. Análisis de irritación de la piel**

[0132] En algunas realizaciones, los equivalentes de piel de la presente invención se utilizan en ensayos de genes informadores para el análisis de compuestos por su actividad irritante de la piel. En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona métodos de utilización del equivalente de piel para identificar nuevos genes que son sensibles a irritantes de la piel conocidos. Los nuevos genes identificados utilizando los métodos de la presente solicitud son útiles adicionalmente en la generación de construcciones génicas informadoras adicionales para cribar potenciales irritantes de la piel.

60 **[0133]** Se han llevado a cabo experimentos de cribado inicial para confirmar que transfectantes estables de queratinocitos NIKS que expresan un transgén (GFP) muestran una estratificación normal en un cultivo organotípico. Las células NIKS se han transfectado de manera estable con la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* y se ha aislado una población clonal. Se analizó la capacidad de estas células NIKS positivas de GFP transfectadas de forma estable (NIKSGFP) de recrear una arquitectura de tejido normal en cultivos organotípicos. Se congelaron las muestras, se seccionaron en criostato y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Los cultivos se examinaron primero por la expresión y localización de GFP. Además, las secciones se tiñeron con

Hoechst, un colorante nuclear, y hematoxilina y eosina (H&E) para orientar y visualizar las capas celulares de los cultivos. Se visualizaron las secciones de cultivos organotípicos utilizando un microscopio de fluorescencia invertido IX-70 (Olympus) equipado con filtros de GFP y Hoechst (Aumentos, 400X). Las secciones de cultivos de NIKSGFP mostraron que la GFP estaba presente en todas las capas del cultivo organotípico observándose la fluorescencia más intensa en la capa cornificada.

[0134] La histología de los cultivos organotípicos de NIKS^{GFP} se comparó a continuación con la de las células NIKS no transfectadas y queratinocitos BC-1-Ep parentales. Las secciones de apilamientos de NIKS^{GFP} teñidos con H&E mostraron una capa basal organizada y definida y una excelente estratificación sin anomalías con respecto a controles no transfectados y los queratinocitos BC-1-Ep parentales. Los tres cultivos muestran una estratificación celular comparable sin diferencias histológicas destacables a nivel de microscopio óptico.

[0135] Para examinar adicionalmente la capacidad de las células NIKS^{GFP} de diferenciarse normalmente, se analizó la expresión de varios marcadores de diferenciación específicos de queratinocitos mediante microscopía de inmunofluorescencia. A medida que los queratinocitos se mueven a una posición suprabasal en el tejido, sintetizan proteínas específicas de la diferenciación. Los queratinocitos cesan la producción de las queratinas basales K5 y K14 y empiezan a expresar las queratinas K1 y K10 específicas de la diferenciación, que se expresan a lo largo del resto de capas en la epidermis. Se examinaron las secciones de los cultivos organotípicos para la expresión y localización de K10 utilizando inmunofluorescencia indirecta. La queratina 10 se expresó normalmente en las capas suprabasales en cultivos organotípicos de BC-1-Ep, NIKS, y NIKS^{GFP}. Para caracterizar adicionalmente el patrón de diferenciación de las células NIKS^{GFP}, se examinó la expresión y localización de filagrina, que es un marcador de diferenciación de etapa tardía. La diferenciación de queratinocitos en el estrato granuloso se distingue por la presencia de gránulos distintos de queratohialina. Estos gránulos están compuestos de filagrina y otras proteínas que son precursoras para la producción de la envoltura cornificada. La tinción con filagrina en secciones de todos los cultivos organotípicos mostró un patrón de puntos característico de células en la capa granular.

[0136] Además, se analizó la expresión y localización de los componentes de la unión adherente, E-cadherina y P-cadherina. En la epidermis normal, se expresan dos miembros de la familia de cadherina clásica, E-cadherina y P-cadherina, ambas juegan un papel importante en la diferenciación y adhesión celular en la epidermis. La expresión de P-cadherina se limita a la capa basal y la E-cadherina se localiza a lo largo de la epidermis. El patrón de tinción de E-cadherina es normal y se localiza en los límites células-células en secciones de los tres cultivos. Estos datos demuestran que las células NIKS modificadas genéticamente muestran una diferenciación normal. De este modo, se contempla que las células NIKS que contienen construcciones de genes informadores formarán equivalentes de piel cultivados similares a los formados con queratinocitos primarios.

[0137] Los experimentos también se realizaron para confirmar que en respuesta a irritantes conocidos, las células NIKS secretan una citoquina que se sabe que se secreta en respuesta a irritantes de la piel. El ejemplo 3 demostró que las células NIKS secretan IL-1 α en respuesta a un irritante de la piel conocido.

i) Ensayos de genes informadores

[0138] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona células de equivalentes de piel (es decir, NIKS) que comprenden una construcción génica informadora sensible a irritantes de la piel. Las construcciones génicas informadoras adecuadas incluyen, pero sin limitación, las descritas anteriormente. En algunas realizaciones, las células presentan además una función de barrera mejorada.

[0139] Estudios previos indicaron que la expresión de IL-8 se correlaciona bien con la irritación de la piel (de Brugerolle de Fraissinette et al., *Cell Biology and Toxicology*, 15:121 [1999]). Las secuencias publicadas del gen de IL-8 incluyen 1.482 pares de bases de ADN en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción y 102 pares de bases de ADN transcrito no traducido en dirección 5' de la región codificante de IL-8 (Mukaida et al., *J. Immunology*, 143:1366 [1989]). Chang y colaboradores han hallado que un gen informador que contiene secuencias promotoras de IL-8 entre -1472 y +19 es inducido por ácido trans-retinoico en células epiteliales traqueobronquiales (Chang et al., *Am J. Respir Cell Mol Biol.* 22:502 [2000]). Abe et al. han demostrado que los fragmentos promotores de IL-8 que contienen como mínimo 130 pares de bases en dirección 5' del sitio de inicio de la transcripción dirigen la expresión inducible de un gen informador de luciferasa (Abe et al., *Am J. Respir Cell Mol Biol.*, 22:51 [2000]). Este fragmento contiene sitios de unión para NF- κ B, AP-1, y NF-IL-6 y los sitios de unión para estos factores son necesarios para la expresión de IL-8 inducible (revisado en Roebuck, *J. Interferon Cytokine Res.*, 19:429 [1999]).

[0140] Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona células de equivalentes de piel (es decir, NIKS) que comprenden un gen informador en el que la expresión de un gen informador (por ejemplo, una enzima) está controlada por la región reguladora de un gen sensible a irritante. La presente invención no se limita a ningún promotor sensible a irritante. De hecho, se contemplan una variedad de promotores, incluyendo, pero sin limitación, IL-8 e IL-1 α . La presente invención no se limita a la región reguladora completa del gen sensible a irritante. De hecho, en algunas realizaciones, se contemplan los fragmentos que comprenden una parte de la región reguladora. Cualquier región o regiones que sean sensibles a un irritante son útiles en la presente invención. En el ejemplo 4 siguiente se proporciona una guía para determinar si una región determinada de un gen es sensible.

[0141] La presente invención no se limita a ningún gen informador particular. De hecho, se contemplan una variedad de genes informadores, incluyendo, pero sin limitación, fosfatasa alcalina secretada (SEAP), cloramfenicol transferasa, luciferasas de luciérnaga y bacterianas, - galactosidasa, -lactamasa, y proteína verde fluorescente. La producción de estas proteínas, con la excepción de la proteína verde fluorescente, se detecta a través de la utilización de productos quimioluminiscentes, colorimétricos o bioluminiscentes de sustratos específicos (por ejemplo, X-gal y luciferina).

[0142] Las construcciones génicas informadoras contenidas en un plásmido se generan utilizando técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza pSEAP (Tropix, Bedford, MA) para generar una construcción génica informadora. pSEAP es un vector de expresión de mamífero que carece de un promotor y que contiene el gen de SEAP (Berger et al., 1988). El vector contiene un polienlazador para la inserción de promotor/potenciador, así como un intrón y señales de poliadenilación de SV40. El vector se puede propagar en E.coli debido al origen de replicación derivado de pUC19 y el gen de resistencia a ampicilina. Están disponibles otros vectores adecuados para la generación de las construcciones génicas informadoras (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, p β -Gal (informador de β -galactosidasa); Tropix).

[0143] Se establecen líneas celulares de equivalentes de piel estables (por ejemplo, NIKS) que contienen el gen informador, y estas células transfectadas se utilizan para generar equivalentes de piel in vitro. A continuación, las células se utilizan para monitorizar la expresión de la construcción génica informadora en respuesta a un panel de compuestos irritantes (véase el ejemplo 4).

[0144] La expresión por el gen informador se puede medir utilizando cualquier ensayo adecuado. En algunas realizaciones preferidas, la presente invención utiliza lecturas de la expresión génica de irritantes de la piel mediante construcciones génicas informadoras que contienen líneas celulares derivadas de NIKS. La utilización de dichos ensayos incrementa la velocidad y disminuye los costes de utilizar los ensayos para analizar nuevos compuestos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utilizan ensayos de genes informadores quimioluminiscentes que se pueden realizar en 30 minutos o menos. El ejemplo 4 describe un ensayo ilustrativo que es útil en la presente invención.

ii) Cribado de nuevos genes sensibles a irritantes

[0145] En otras realizaciones, la presente solicitud proporciona métodos y composiciones para identificar genes sensibles a irritantes. En algunas realizaciones, a efectos de obtener datos que se correlacionen con la exposición a irritantes en la población general, se analizan los cambios en la expresión génica global en cultivos organotípicos de queratinocitos humanos primarios de donantes agrupados que se han expuesto a irritantes de piel conocidos. Los nuevos genes identificados mediante los métodos de la presente solicitud son útiles en los ensayos de análisis de irritabilidad utilizando líneas celulares informadoras de genes derivadas de equivalente de piel (por ejemplo, NIKS) y una matriz de expresión génica para predecir la irritabilidad.

[0146] Las matrices de expresión génica se han utilizado satisfactoriamente para obtener nuevas perspectivas en las respuestas de la expresión génica global de células de mamífero al suero (Iyer et al., Science 283:83 [1999]) y los mecanismos de señalización específicos del factor de crecimiento (Fambrough et al., Cell 97:727 [1999]). Además, se ha establecido recientemente que se puede diferenciar un análisis clúster (Eisen et al., PNAS 95:14863 [1998]) de patrones de expresión génica y se puede predecir diferentes formas de cáncer (leucemia mieloide aguda frente a leucemia linfoblástica aguda) (Golub et al., Science 286:531 [1999]). El análisis de la expresión de 6817 genes humanos en estas dos formas de cáncer condujo a la generación de una matriz "predictora" de los 50 genes más informativos que diferenciaban de manera satisfactoria un grupo independiente de muestras de pacientes (Golub et al., Supra). Este es un ejemplo importante de análisis de matriz de ADN para derivar un subgrupo de genes conocidos y nuevos, cuyo patrón global se puede diferenciar de los matices de dos estados celulares de enfermedad diferentes. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se utilizan matrices de genes para identificar nuevos genes secretados en respuesta a irritantes conocidos.

[0147] Las matrices de expresión génica están disponibles en una variedad de formatos de una serie de fuentes comerciales, incluyendo, pero sin limitación, matrices basados en filtros (Research Genetics and Clontech), matrices de ADNc de portaobjetos de vidrio (Incyte-Genome Systems) y micromatrices de oligonucleótidos de ADN (Affymetrix). En un ejemplo ilustrativo (Ejemplo 5), se utilizan micromatrices de ADNc (Genome Systems) para cribar queratinocitos humanos cultivados tratados con irritantes conocidos.

[0148] Los métodos de cribado de la presente solicitud se utilizan para generar una base de datos de cambios de la expresión génica en queratinocitos humanos en respuesta a múltiples irritantes de piel conocidos. La información contenida en la base de datos es útil en el desarrollo de matrices de expresión de genes que predicen la irritabilidad. Dichas matrices se utilizan para generar un perfil de irritabilidad que es probablemente un indicador mejor de la irritación de la piel in vivo que los ensayos individuales de punto final utilizados actualmente. Las lecturas simples de la expresión génica de irritantes de piel por líneas celulares derivadas de equivalente de piel (por ejemplo, NIKS) que comprenden construcciones de genes informadores incrementarán la velocidad y disminuirán los costes de

utilización de estos ensayos para probar nuevos compuestos.

3. Sustratos para cultivar tumores y agentes patológicos

5 **[0149]** Se contempla que los equivalentes de piel de la presente invención son también útiles para el cultivo y estudio de tumores que aparecen de forma natural en la piel, así como para el cultivo y estudio de patógenos que afectan a la piel. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se contempla que los equivalentes de piel de la presente invención se siembran con células malignas. A modo de ejemplo no limitante, los equivalentes de piel se pueden sembrar con células SCC13y malignas tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.989.837 para proporcionar un modelo de carcinoma de célula escamosa humana. Estos equivalentes de piel sembrados se pueden utilizar a continuación para cribar compuestos u otras estrategias de tratamiento (por ejemplo, radiación o tomoterapia) para la eficacia contra el tumor en su medio natural. De este modo, algunas realizaciones de la presente solicitud proporcionan métodos que comprenden proporcionar un equivalente de piel que comprende células malignas o un tumor y por lo menos un compuesto de prueba, tratar el equivalente de piel con el compuesto y analizar el efecto del tratamiento en las células malignas o tumores. En otras realizaciones de la presente solicitud, se proporcionan métodos que comprenden proporcionar un equivalente de piel que comprende células malignas o un tumor y por lo menos una terapia de prueba (por ejemplo, radiación o fototerapia), tratar el equivalente de piel con la terapia, y analizar el efecto de la terapia en las células malignas o tumores.

20 **[0150]** En otras realizaciones, los equivalentes de piel se utilizan para cultivar y estudiar patógenos de la piel. A modo de ejemplo no limitante, los equivalentes de piel se infectan con virus del papiloma humano (HPV), tal como HPV18. Los métodos para preparar equivalentes de piel infectados con HPV se describen en la patente de Estados Unidos No. 5,994,115. De este modo, algunas realizaciones de la presente solicitud proporcionan métodos que comprenden proporcionar un equivalente de piel infectado con un patógeno de interés y por lo menos un compuesto o tratamiento de prueba o tratar el equivalente de piel con el compuesto o tratamiento de prueba. En algunas realizaciones preferidas, los métodos comprenden además analizar el efecto del compuesto o tratamiento de prueba sobre el patógeno. Dichos ensayos se pueden realizar analizado la presencia, ausencia o cantidad de patógeno en el sustituto de piel después del tratamiento. Por ejemplo, se puede realizar un ELISA para detectar o cuantificar el patógeno. En algunas realizaciones particularmente preferidas, el patógeno es un patógeno viral, tal como HPV.

30 **[0151]** Los equivalentes de piel de la presente invención son útiles en aplicaciones de cicatrización de heridas y tratamiento de quemaduras. La utilización de autoinjertos y aloinjertos para el tratamiento de quemaduras y cicatrización de heridas se describe en Myers et al., A. J. Surg. 170(1):75-83 (1995) y las patentes de Estados Unidos Nos. 5,693,332; 5,658,331; y 6,039,760. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se pueden utilizar conjuntamente con sustituciones dérmicas, tales como DERMAGRAFT. En otras realizaciones, los equivalentes de piel se producen utilizando tanto una fuente estándar de queratinocitos (por ejemplo, células NIKS) y queratinocitos del paciente que recibirá el injerto. Por lo tanto, el equivalente de piel contiene queratinocitos de dos fuentes diferentes. En realizaciones adicionales, el equivalente de piel contiene queratinocitos de un aislado de tejido humano. Por consiguiente, la presente solicitud proporciona métodos para la cicatrización de heridas, incluyendo heridas causadas por quemaduras, que comprende proporcionar un equivalente de piel que tiene una función de barrera mejorada según la presente invención y un paciente que padece una herida y tratar el paciente con el equivalente de piel bajo condiciones tales que se cierra la herida.

35 **[0151]** Los equivalentes de piel de la presente invención son útiles en aplicaciones de cicatrización de heridas y tratamiento de quemaduras. La utilización de autoinjertos y aloinjertos para el tratamiento de quemaduras y cicatrización de heridas se describe en Myers et al., A. J. Surg. 170(1):75-83 (1995) y las patentes de Estados Unidos Nos. 5,693,332; 5,658,331; y 6,039,760. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se pueden utilizar conjuntamente con sustituciones dérmicas, tales como DERMAGRAFT. En otras realizaciones, los equivalentes de piel se producen utilizando tanto una fuente estándar de queratinocitos (por ejemplo, células NIKS) y queratinocitos del paciente que recibirá el injerto. Por lo tanto, el equivalente de piel contiene queratinocitos de dos fuentes diferentes. En realizaciones adicionales, el equivalente de piel contiene queratinocitos de un aislado de tejido humano. Por consiguiente, la presente solicitud proporciona métodos para la cicatrización de heridas, incluyendo heridas causadas por quemaduras, que comprende proporcionar un equivalente de piel que tiene una función de barrera mejorada según la presente invención y un paciente que padece una herida y tratar el paciente con el equivalente de piel bajo condiciones tales que se cierra la herida.

45 **[0152]** En otras realizaciones, el equivalente de piel se diseña para proporcionar un agente terapéutico a un sujeto. De hecho, se contempla que se pueden administrar una serie de agentes terapéuticos al sujeto, incluyendo, pero sin limitación, enzimas, péptidos, hormonas peptídicas, otras proteínas, ARN ribosómico, ribozimas, y ARN antisentido. Estos agentes terapéuticos se pueden administrar para una serie de fines, incluyendo, pero sin limitación, el objetivo de corregir defectos genéticos. En algunas realizaciones preferidas particulares, el agente terapéutico se administra para el objetivo de detoxificar un paciente con un error de metabolismo hereditario innato (por ejemplo, aminoacidopatías), en el que el injerto sirve como tejido de tipo natural. Se contempla que la administración del agente terapéutico corrige el defecto. En algunas realizaciones, los queratinocitos utilizados para formar el equivalente de piel se transfectan con una construcción de ADN que codifica un agente terapéutico (por ejemplo, insulina, factor de coagulación IX, eritropoyetina, etc) y el equivalente de piel se injerta en el sujeto. A continuación, el agente terapéutico se administra al torrente sanguíneo del paciente u otros tejidos del injerto. En realizaciones preferidas, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico está unido operativamente a un promotor adecuado. Se contempla la utilización de una serie de promotores, incluyendo, pero sin limitación, promotores inducibles, constitutivos, específicos de tejido y específicos de queratinocito. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se introduce directamente en los queratinocitos (es decir, mediante coprecipitación con fosfato de calcio o mediante la transfección con liposomas). En otras realizaciones preferidas, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se proporciona como un vector y el vector se introduce en los queratinocitos mediante métodos conocidos en el sector. En algunas realizaciones, el vector es un vector episomal, tal como un plásmido. En otras realizaciones, el vector se integra en el genoma de los queratinocitos. Entre los ejemplos de vectores que se

50 **[0152]** En otras realizaciones, el equivalente de piel se diseña para proporcionar un agente terapéutico a un sujeto. De hecho, se contempla que se pueden administrar una serie de agentes terapéuticos al sujeto, incluyendo, pero sin limitación, enzimas, péptidos, hormonas peptídicas, otras proteínas, ARN ribosómico, ribozimas, y ARN antisentido. Estos agentes terapéuticos se pueden administrar para una serie de fines, incluyendo, pero sin limitación, el objetivo de corregir defectos genéticos. En algunas realizaciones preferidas particulares, el agente terapéutico se administra para el objetivo de detoxificar un paciente con un error de metabolismo hereditario innato (por ejemplo, aminoacidopatías), en el que el injerto sirve como tejido de tipo natural. Se contempla que la administración del agente terapéutico corrige el defecto. En algunas realizaciones, los queratinocitos utilizados para formar el equivalente de piel se transfectan con una construcción de ADN que codifica un agente terapéutico (por ejemplo, insulina, factor de coagulación IX, eritropoyetina, etc) y el equivalente de piel se injerta en el sujeto. A continuación, el agente terapéutico se administra al torrente sanguíneo del paciente u otros tejidos del injerto. En realizaciones preferidas, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico está unido operativamente a un promotor adecuado. Se contempla la utilización de una serie de promotores, incluyendo, pero sin limitación, promotores inducibles, constitutivos, específicos de tejido y específicos de queratinocito. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se introduce directamente en los queratinocitos (es decir, mediante coprecipitación con fosfato de calcio o mediante la transfección con liposomas). En otras realizaciones preferidas, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se proporciona como un vector y el vector se introduce en los queratinocitos mediante métodos conocidos en el sector. En algunas realizaciones, el vector es un vector episomal, tal como un plásmido. En otras realizaciones, el vector se integra en el genoma de los queratinocitos. Entre los ejemplos de vectores que se

65 **[0152]** En otras realizaciones, el equivalente de piel se diseña para proporcionar un agente terapéutico a un sujeto. De hecho, se contempla que se pueden administrar una serie de agentes terapéuticos al sujeto, incluyendo, pero sin limitación, enzimas, péptidos, hormonas peptídicas, otras proteínas, ARN ribosómico, ribozimas, y ARN antisentido. Estos agentes terapéuticos se pueden administrar para una serie de fines, incluyendo, pero sin limitación, el objetivo de corregir defectos genéticos. En algunas realizaciones preferidas particulares, el agente terapéutico se administra para el objetivo de detoxificar un paciente con un error de metabolismo hereditario innato (por ejemplo, aminoacidopatías), en el que el injerto sirve como tejido de tipo natural. Se contempla que la administración del agente terapéutico corrige el defecto. En algunas realizaciones, los queratinocitos utilizados para formar el equivalente de piel se transfectan con una construcción de ADN que codifica un agente terapéutico (por ejemplo, insulina, factor de coagulación IX, eritropoyetina, etc) y el equivalente de piel se injerta en el sujeto. A continuación, el agente terapéutico se administra al torrente sanguíneo del paciente u otros tejidos del injerto. En realizaciones preferidas, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico está unido operativamente a un promotor adecuado. Se contempla la utilización de una serie de promotores, incluyendo, pero sin limitación, promotores inducibles, constitutivos, específicos de tejido y específicos de queratinocito. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se introduce directamente en los queratinocitos (es decir, mediante coprecipitación con fosfato de calcio o mediante la transfección con liposomas). En otras realizaciones preferidas, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se proporciona como un vector y el vector se introduce en los queratinocitos mediante métodos conocidos en el sector. En algunas realizaciones, el vector es un vector episomal, tal como un plásmido. En otras realizaciones, el vector se integra en el genoma de los queratinocitos. Entre los ejemplos de vectores que se

integran se incluyen, pero sin limitación, vectores retrovirales, vectores de virus adenoasociados y vectores transposones.

Parte Experimental

5 [0153] Los siguientes ejemplos se proporcionan a efectos de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos de la misma.

10 [0154] En la descripción experimental siguiente, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar); mM (micromolar); N (Normal); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); μ g (microgramos); ng (nanogramos); l o L (litros); ml (mililitros); μ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros); nm (nanómetros); C (grados centígrados); U (unidades), mU (miliunidades); min. (minutos); s (segundos); % (por ciento); kb (kilobase); bp (pares de bases); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); BSA (albúmina de suero bovino).

15 Ejemplo 1

Efecto de las Condiciones de Cultivo en la Función de Barrera Epidérmica de Células NIKS

20 [0155] Aunque se ha demostrado que un conjunto de condiciones de cultivo aumentan varios aspectos de la función de barrera (véase la tabla 1, supra), no ha habido un intento sistemático de examinar los efectos sinérgicos de estas condiciones. Este ejemplo proporciona una valoración de los efectos combinados de ácido ascórbico, activadores de PPAR (ácido linoleico), activadores de FXAR (farnesol) y una humedad relativa reducida en la función de barrera epidérmica de cultivos organotípicos NIKS. Las propiedades de barrera de cultivos tratados se evalúan mediante la medición de la capacitancia eléctrica de superficie (SEC) (Boyce et al., J. Invest. Dermatol., 107(1): p. 82-7 (1996)), el análisis de la composición lipídica extracelular y mediante el examen ultraestructural de secciones de tejido mediante microscopía electrónica.

30 [0156] Las condiciones de cultivo a evaluar se presentan en la tabla 2. Se añaden individualmente o combinados complementos de cultivo al medio de cornificación en las concentraciones indicadas. Los cultivos organotípicos se incuban en la interfase aire/líquido durante 14-17 días antes del análisis. Los cultivos basados en NIKS consisten en compartimentos dérmicos y epidérmicos. El compartimento dérmico consiste en una base de colágeno y se forma mediante la mezcla de fibroblastos neonatales humanos normales, cepa CI-1-F, con colágeno Tipo 1 en medio F-12 de Ham que contenía suero de ternera fetal (FCS) al 10% y penicilina/estreptomina (P/S) y permitiendo la contracción. El compartimento epidérmico se produce mediante la siembra de las células NIKS sobre gel de colágeno contraído en 25 μ l de una mezcla de F-12 de Ham: DME, (3:1, concentración final de calcio 1,88 mM) complementada con FCS al 0,2%, hidrocortisona (HC) 0,4 μ g/ml, 8,4 ng/ml de toxina de cólera (CT), 5 μ g/ml de insulina (Ins), 24 μ g/ml de adenina (Ade), y 100 unidades/ml P/S. Las células se dejan unir 2 horas antes de llenar la cámara de cultivo con medio (día 0). En los días 1 y 2, se realimentan las células. En el día 4, las células se elevan a la interfase de aire con una almohadilla de algodón y se cambian al medio de cornificación que contenía F-12 de Ham:DME (3:1, concentración final de calcio 1,88 mM) complementado con FCs al 2%, HC 0,4 μ g/ml, CT 8,4 ng/ml, Ins 5 μ g/ml, Ade 24 μ g/ml, y P/S. A las células se les alimenta con medio de cornificación nuevo cada tres días.

45 [0157] Para la medición de SEC, la impedancia de las superficies de cultivo se determina utilizando un medidor de la impedancia Dermaphase 9003 (NOVA Technologies Corp, Portsmouth, NH). Este instrumento proporciona una medición de la conductividad eléctrica de la superficie de la piel, que está relacionada directamente con el estado de hidratación de la muestra y propiedades de barrera. La sonda se coloca en contacto con la superficie de cultivo y se toman lecturas inmediatamente después del contacto con la sonda y al final del periodo de 10 segundos. A continuación, la lectura inicial se compara con la lectura después de que la sonda se haya colocado durante 10 segundos. Un incremento en la lectura después de 10 segundos refleja una hidratación incrementada de la superficie de cultivo debido a la oclusión de la superficie de la piel por la sonda. Dado que la hidratación de la superficie está determinada ampliamente por la permeabilidad del estrato córneo, la magnitud de la diferencia entre las lecturas de SEC iniciales y finales proporciona una medición de las propiedades de barrera de los cultivos. Cada condición de cultivo se analiza por triplicado y se comparan las mediciones promedio de la impedancia con condiciones de cultivo estándar no complementados para valorar las mejoras en la función de barrera. Las lecturas de SEC de los cultivos in vitro también se comparan con las mediciones de SEC obtenidas de piel humana normal. Los estudios previos han demostrado que los valores de SEC de sustitutos de piel in vitro (400 pF) son aproximadamente diez veces más elevados que los observados con piel humana normal. El objetivo de estos experimentos es desarrollar condiciones que mejoren la función de barrera de cultivos de queratinocitos organotípicos, de manera que las lecturas de SEC de estos cultivos son como máximo 2-3 veces más elevadas que en la piel normal.

60

Tabla 2: Complementos de cultivo y humedad

Ácido ascórbico	Ácido linoleico	Farnesol	Humedad
			100%
			75%
50 microgramos/ml			100%
50 microgramos/ml			75%
	30 micromolar		100%
	30 micromolar		75%
		50 micromolar	100%
		50 micromolar	75%
50 microgramos/ml	30 micromolar		100%
50 microgramos/ml	30 micromolar		75%
50 microgramos/ml		50 micromolar	100%
50 microgramos/ml		50 micromolar	75%
	30 micromolar	50 micromolar	100%
	30 micromolar	50 micromolar	75%
50 microgramos/ml	30 micromolar	50 micromolar	100%
50 microgramos/ml	30 micromolar	50 micromolar	75%

[0158] Las composiciones lipídicas de sustitutos de piel in vitro examinadas hasta ahora muestran diferencias significativas en comparación con las halladas en piel humana normal. En particular, los niveles de ceramidas 6 y 7 se reducen ampliamente en los cultivos in vitro. Para determinar si la preparación de cultivos de piel organotípicos utilizando condiciones de cultivo mostradas en la tabla 2 tiene un efecto sinérgico en la composición lipídica epidérmica, se comparan los perfiles de lípidos de cultivos complementados con lípidos aislados de cultivos de control no complementados y con lípidos extraídos de piel humana normal. Los perfiles de lípidos de los cultivos se determinan mediante cromatografía de capa fina de rendimiento elevado (HPTLC) de lípidos extraídos de las capas de cultivo epidérmicas. Los cultivos organotípicos se calientan hasta 60°C durante 1 minuto para separar las capas epidérmicas y dérmicas. Los lípidos totales se extraen de la capa epidérmica mediante extracción secuencial con 2 ml de cloroformo/metanol (1:2), 2 ml de cloroformo/metanol/agua (1:2:0.5), 2 ml de cloroformo/metanol (1:2), 2 ml de cloroformo/metanol (2:1) y finalmente con 2 ml de cloroformo. Después de la adición de 0,2 ml de KCl al 2,5% y 2 ml de agua, las muestras se centrifugan y la fase inferior se extrae a un tubo limpio. La fase superior restante se extrae con 4 ml de cloroformo. El extracto de cloroformo se combina con la fase inferior del extracto inicial. Se extraen los disolventes mediante evaporación bajo nitrógeno y los lípidos extraídos se disuelven en cloroformo/metanol (2:1). El contenido total de lípidos en los extractos se determina mediante el peso de las muestras del extracto después de la evaporación del disolvente.

[0159] Los lípidos extraídos (50 microgramos) se aplican a placas de gel de sílice 60 HPTLC (Merck, Darmstad, FRG) y se separan mediante HPTLC unidimensional utilizando el sistema de revelado con ceramidas. La separación de lípidos se consigue mediante el revelado secuencial de las placas de HPTLC en cloroformo, cloroformo/acetona/metanol (76:8:16), cloroformo/acetato de hexilo/acetona/metanol (86:1:10:4), cloroformo/acetona/metanol (76:4:20), cloroformo/dietil éter/acetato de hexilo/acetato de etilo/acetona/metanol (72:4:1:4:16:4), y finalmente con hexano/dietil éter/acetato de etilo (80:16:4). La placa de TLC se seca brevemente después de cada etapa de revelado antes de proceder al siguiente sistema de disolventes. Después de la separación, los lípidos se detectan mediante la tinción con acetato de cobre y sulfato de cobre en ácido sulfúrico, seguido de carbonización. Cada condición de cultivo se analiza por triplicado y se cuantifican los niveles de componentes lipídicos específicos mediante densitometría y se expresan como un porcentaje de lípidos totales. Estudios previos han mostrado que las ceramidas 5-7 comprenden sólo un 10% de la masa total de ceramidas de sustitutos de piel in vitro en comparación con el 39% en epidermis normal. Existe un incremento correspondiente en ceramida 2 en los cultivos in vitro, que comprende aproximadamente el 50% de la masa total de ceramida en comparación con el 22% en piel normal. En realizaciones preferidas, los equivalentes de piel de la presente invención se cultivan bajo una condición que da lugar a un incremento en el contenido de ceramidas 5-7 a entre 30 y 45% de la masa total de ceramida y una reducción de los niveles de ceramida 2 a entre el 20 y 30% de la masa total de ceramida.

[0160] La ultraestructura de lamelas lipídicas en cultivos organotípicos preparados bajo las condiciones descritas en la tabla 2 se examina mediante microscopía electrónica. Los cultivos se fijan en glutaraldehído al 2% y formaldehído al 2% en tampón de cacodilato 0,1 M, pH 7,4, a continuación se post-fija en tetróxido de osmio al 1%, seguido de tetróxido de rutenio al 0,25%. Las muestras se deshidratan a través de una serie de etanol, incluidos en Eponato, y se dividen en un microtomo Reichert Ultracut. Las secciones se tiñen con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinan utilizando un microscopio electrónico Hitachi H-7000 (Hitachi, San Jose, CA). Los cultivos organotípicos producidos por las condiciones indicadas en la tabla 2 se examinan para la restauración del patrón de lamelas lipídicas alternantes densas de electrones y luminosas de electrones observadas en piel normal.

[0161] También se evalúan los cultivos organotípicos para la proliferación celular y marcadores de diferenciación específica de tipo de célula, incluyendo involucrina, transglutaminasa y queratinas.

Ejemplo 2**Expresión de Klf4 exógena en células NIKS**

[0162] Este ejemplo describe la expresión de Klf4 exógena en células NIKS. El factor de transcripción factor 4 de tipo Krüppel (Klf4) es una proteína de dedos de zinc expresada a niveles elevados en el epitelio sometido a diferenciación terminal, especialmente la piel y el epitelio intestinal. En la piel, se enriquece en la capa suprabasal mitóticamente inactiva de la epidermis. Se identificó Klf4 mediante hibridación de baja rigurosidad con una sonda para un dominio de dedos de zinc en una biblioteca de ADNc de células NIH 3T3 (Shields et al., *J. Biol. Chem.*, 271(33): 20009-17 (1996)). Sus tres dedos de zinc C2H2 la relacionan con una familia de factores de transcripción de dedos de zinc que incluye EKLF y LKLF, factores que son importantes para la diferenciación específica de tejido. Se expresa a niveles más elevados en células de crecimiento detenido y a niveles indetectables en células proliferativas. La expresión constitutiva de células COS-1 con Klf4 inhibe la síntesis de ADN. Se une a una secuencia de ADN definida que es importante en la regulación del gen CYP1A1 del citocromo P450 (Zhang et al., *J. Biol. Chem.*, 273(28): 17917-25 (1998)). La unión de Klf4 a su sitio de unión en CYP1A1 inhibe la expresión de CYP1A1, probablemente mediante competición por la unión al ADN con SP1 y a través de las interacciones directas de proteína-proteína con SP1. Estudios recientes describen que Klf4 también regula su propia expresión y que una interacción de unión importante es con p300/CBP (Geiman et al., *Nucleic Acids Res.*, 28(5): 1106-1113 (2000); Mahatan et al., *Nucleic Acids Res.*, 27(23): 4562-9 (1999)). Al igual que con otros factores de transcripción claves, la Klf4 puede ser un activador potente de algunos genes y un represor de otros.

[0163] Klf4 es actualmente el mejor gen candidato para un regulador clave de la función de barrera en la piel. La eliminación de la expresión de Klf4 en ratones da lugar a una mortalidad neonatal, aparentemente como resultado de una pérdida excesiva de agua a través de una barrera de permeabilidad epidérmica defectuosa. Estas observaciones sugieren que la Klf4 regula los genes que son esenciales para la formación de una barrera de permeabilidad epidérmica normal y aumentan la posibilidad de que la expresión de Klf4 en sustitutos de piel cultivados pueda mejorar la función de barrera de estos cultivos. Este ejemplo describe dos métodos de expresión de Klf4 en la diferenciación de queratinocitos. El primer método es la generación de una construcción de expresión inducible en la que la expresión de Klf4 humana está regulada por la presencia o ausencia del derivado de tetraciclina, doxiciclina, en el medio de cultivo. Un segundo método de dirección de la expresión de Klf4 en cultivos organotípicos utiliza un fragmento de ADN que contiene 3,7 kb de la región promotora de involucrina, que dirige la expresión en la diferenciación de queratinocitos (Carroll et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (21): p. 10270-4 (1993)) o 135 pares de bases de la región promotora de transglutaminasa 3, que también dirige la expresión en la diferenciación de queratinocitos (Lee et al., *J. Biol. Chem.*, 271(8): 4561-8 (1996)).

[0164] El ADNc que codifica la Klf4 humana se aísla mediante PCR utilizando cebadores para la secuencia conocida de Klf4 (Y et al., *J. Biol. Chem.*, 273(2): 1026-31 (1998)). El ADNc de Klf4 se clona en el vector de expresión pTRE2 (Clontech, Palo Alto, CA), que contiene un promotor de CMV mínimo flanqueado por siete repeticiones del operador tet (tetO). La integridad del ADNc de Klf4 clonado se verifica mediante el análisis de secuencia utilizando cebadores derivados de la secuencia de Klf4 conocida.

[0165] El ADN purificado del plásmido de expresión de Klf4 se introduce en las células NIKS junto con el plásmido pTet-On (Clontech, Palo Alto, CA), que codifica un derivado de la proteína represora de tet. Esta proteína, rtTA, se une al operador tet en presencia de doxiciclina e induce la expresión de Klf4 cuando la doxiciclina está presente en el medio de cultivo. El gen que codifica una proteína que confiere resistencia a blasticidina se amplificará por PCR y se clonará en el plásmido pTet-On para permitir la selección de células transfectadas de forma estable. Las células transfectadas se seleccionan mediante crecimiento en un medio que contiene blasticidina (5 microgramos/ml), que eliminará cualquier célula NIKS que no ha incorporado los plásmidos en su genoma. Las líneas celulares estables que contienen los plásmidos pTRE2-Klf4 y pTet-On se identifican mediante el examen de múltiples líneas celulares clonales por transferencia Southern utilizando sondas marcadas con digoxigenina derivadas de los plásmidos pTet-On y pTRE2. Los clones múltiples que contienen copias intactas de los plásmidos pTet-On y pTRE2 se aíslan y examinan para la expresión del transgén Klf4 en presencia de doxiciclina.

[0166] Para examinar la expresión del transgén de Klf4, los cultivos monocapas de líneas celulares transfectadas de manera estable y las células no transfectadas de control se incuban en medio que contiene doxiciclina (1 microgramo por ml). A continuación, se aísla el ARN total de cultivos en múltiples puntos de tiempo después de la adición de doxiciclina utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies, Rockville, MD). Se analizan veinte microgramos de ARN total mediante hibridación de transferencia Northern utilizando sondas marcadas con digoxigenina derivadas del ADNc de Klf4 clonado y se detectan utilizando el sistema de detección no radioactivo Genius (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). El ARN también se aísla de cultivos transfectados desarrollados en ausencia de doxiciclina para determinar el nivel basal de expresión de Klf4 del transgén. El ARN aislado de células no transfectadas en cada punto de tiempo se analizará para establecer un nivel base de expresión de Klf4 del gen de Klf4 endógeno.

[0167] El ADNc de Klf4 también se clona en un plásmido de expresión que contiene secuencias de promotores del gen de involucrina. Un fragmento de ADN que contiene 3,7 kb del promotor dirige la expresión de transgenes a las capas suprabasales de la epidermis. Este fragmento de promotor se amplifica a partir del ADN genómico mediante

PCR utilizando cebadores para la secuencia promotora de INV conocida (Lopez-Bayghen et al., J. Biol. Chem., 271(1): 512-520 (1996)). El ADNc de Klf4 se clona en un plásmido que contiene este fragmento de promotor de involucrina y se utiliza para generar líneas celulares estables de NIKS que contienen este transgén. Las líneas celulares estables se seleccionan mediante la cotransfección de células NIKS con el plásmido INV/Klf4 y un plásmido que expresa la resistencia a blasticidina y el crecimiento de las células transfectadas en presencia de blasticidina. Se aislarán múltiples líneas celulares de resistencia a blasticidina y se examinarán mediante transferencia Northern por la expresión incrementada de Klf4 en comparación con células transfectadas sólo con el plásmido de resistencia a blasticidina. Aunque el promotor de involucrina se ha utilizado satisfactoriamente para dirigir la expresión de varios transgenes a la epidermis diferenciadora, es posible que la construcción INV/KLF4 no se expresará hasta niveles suficientemente elevados o en el patrón temporal o espacial correcto para tener un efecto en la función de barrera. Si la expresión de Klf4 a partir de la construcción con el promotor de involucrina no se detecta fácilmente, se generan construcciones de expresión que contienen las regiones promotoras de otro gen específico de queratinocito, la transglutaminasa 3. El ADNc de Klf4 se clona en un plásmido de expresión que contiene secuencias promotoras a partir del gen de transglutaminasa 3 (TG3). Un fragmento de promotor TG3 que contiene 126 pb en dirección 5' y 10 pb en dirección 3' desde el sitio de inicio de la transcripción dirige la expresión de transgenes a las células epiteliales (Lee et al., J Biol Chem, 271(8): 4561-8 [1996]).

[0168] El ADNc de Klf4 se clona en un plásmido que contiene este fragmento promotor de TG3 y se generan líneas celulares estables de NIKS que contienen este transgén. Las líneas celulares estables se seleccionan mediante la cotransfección de células NIKS con el plásmido TG3/Klf4 y un plásmido que expresa el gen de resistencia a blasticidina y el crecimiento de las células transfectadas en presencia de blasticidina. Las múltiples líneas celulares resistentes a blasticidina se aíslan y examinan mediante transferencia Northern para la expresión aumentada de Klf4 en comparación con células transfectadas sólo con el plásmido con resistencia a blasticidina.

[0169] Se examinan líneas celulares NIKS estables que expresan Klf4 a partir del promotor de involucrina o el sistema inducible por doxiciclina en un cultivo organotípico para confirmar que se expresa Klf4 bajo estas condiciones de cultivo. El medio y procedimientos estándar para cultivos organotípicos se describen en el ejemplo 1. Las células NIKS que expresan Klf4 se siembran sobre una matriz de colágeno que contiene fibroblastos y se desarrollan en un cultivo sumergido durante 4 días antes de elevarse a la interfase de aire. Los cultivos organotípicos se alimentan de medio de cornificación cada 3 días y se mantienen en la interfase aire/líquido durante 14 días para formar un epitelio estratificado. Los cultivos con NIKS que expresan Klf4 a partir del promotor inducible se desarrollan en un medio que contiene 1 microgramo/ml de doxiciclina. Se aísla el ARN total de los cultivos organotípicos mediante la homogenización de la capa epidérmica en reactivo Trizol, extrayendo el homogenato con cloroformo, y precipitando el ARN total con isopropanol. El ARN se examina por la expresión de Klf4 tal como se describe anteriormente para cultivos monocapa.

[0170] Los efectos de la expresión de Klf4 en la función de barrera se examinan mediante la medición de la capacitancia de superficie, la composición lipídica y la ultraestructura de los cultivos organotípicos mediante los métodos descritos en el ejemplo 1. Además, algunos de los agentes a añadir a los cultivos en el ejemplo 1, especialmente los activadores de PPAR y FXAR, pueden servir para activar otros genes reguladores que actúan en concordancia con Klf4. Esta hipótesis está apoyada por la capacidad de estos agentes de acelerar el desarrollo en el útero de la función de barrera.

[0171] Los datos sobre la evolución y extensión de la expresión de Klf4 utilizando los dos sistemas de expresión descritos en el presente documento permitirán el diseño de estrategias para aumentar la función de barrera mediante la regulación de la expresión de Klf4 en cultivos organotípicos de NIKS. Los cultivos organotípicos de NIKS se han caracterizado ampliamente para la ultraestructura y la expresión de los marcadores de diferenciación clave. El examen de estas propiedades fenotípicas del cultivo en presencia de la expresión de Klf4 añadida proporcionará ideas adicionales a las consecuencias de la expresión de Klf4.

Ejemplo 3

Secreción de IL-1 α en respuesta a irritantes de la piel

[0172] Este ejemplo demuestra que las células NIKS secretan IL-1 α en respuesta a irritantes de piel. Para determinar si los cultivos organotípicos de células NIKS muestran respuestas a irritantes típicas de queratinocitos primarios, los cultivos de equivalentes de piel NIKS se expusieron a concentraciones de SDS que se sabe que producen respuestas a irritantes de la piel in vivo e in vitro. Se aplicaron tópicamente soluciones de SDS (0,1%, 0,2%, y 0,5%) a cultivos organotípicos de NIKS expuestos a aire y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después de 24 horas, se analizó el medio por debajo de los cultivos por la proteína IL-1 α utilizando un kit de LISA de IL-1 α Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN) y los cultivos se incubaron con reactivo MTS (Promega Corp., Madison, WI) para determinar la viabilidad celular. Las concentraciones de IL-1 α en medio de cultivo de control y tratado con SDS se muestran en la figura 3. El medio de cultivo no tratado contenía 25 pg/ml de IL-1 α , mientras que la concentración de IL-1 α en cultivos tratados con SDS al 0,1%, 0,2% ó 0,5% fue de 290, 375 y 275 pg/ml respectivamente.

[0173] Estos valores se corresponden con las respuestas de IL-1 α publicadas en equivalentes de piel expuestos a SDS (Perkins et al., Toxicological Sciences, 48:218 [1999]). La disminución en la secreción de IL-1 α en cultivos tratados con SDS al 0,5% es probablemente debida a la disminución de la viabilidad celular en estos cultivos detectada mediante un ensayo MTS.

5

Ejemplo 4

Generación de construcciones de genes informadores

[0174] Este ejemplo describe métodos para generar células NIKS que comprenden construcciones de genes informadores que comprenden fragmentos promotores de IL-8. Utilizando cebadores para la secuencia conocida, se utiliza la PCR para amplificar un fragmento de ADN de 1,5 kb que contiene el promotor de IL-8 y secuencias flanqueantes. Después de la verificación del ADN amplificado mediante el análisis de secuencia, este fragmento de ADN se clona en el vector de expresión pSEAP (Tropix, Bedford, MA), que contiene la región codificante para SEAP, pero carece de elementos reguladores para dirigir su expresión. Esta integridad de la construcción informadora se verifica mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

15

[0175] Inicialmente los experimentos para determinar si la construcción informadora IL-8/SEAP es inducible por irritantes se realizan con células NIKS transfectadas de manera transitoria. Se exponen grupos de células transfectadas a irritantes conocidos (por ejemplo, SDS, ácido trans-retinoico) y a sustancias de control (por ejemplo, aceite mineral, agua) y se determina la cantidad de actividad de SEAP mediante quimioluminiscencia a 4, 8 y 24 horas después de la exposición a irritante. La actividad de SAP se detecta mediante incubación de medio de células transfectadas con un sustrato quimioluminiscente (Phospha-light, Tropix, Bedford, MA) utilizando un luminómetro de microplaca. El análisis de la expresión del gen informador de IL-8/SEAP se realiza por triplicado utilizando poblaciones de células transfectadas de forma independiente.

20

25

[0176] La expresión de ARN a partir del informador IL-8/SEAP se compara con los incrementos en el ARNm del gen de IL-8 endógeno. En paralelo con los ensayos de SEAP descritos anteriormente, se aísla el ARN de cultivos tratados idénticamente utilizando el reactivo Trizol (Life Technologies, Rockville, MD). Como medición independiente de la expresión de IL-8 en queratinocitos tratados con irritante, se tratan los cultivos de queratinocitos primarios de donantes agrupados con los irritantes y se procesan para la purificación de ARN. Se examina el ARN total mediante transferencia Northern por la expresión incrementada del gen de IL-8 endógeno utilizando un fragmento de PCR amplificado en base a secuencias conocidas. También se cuantifica el nivel de ARNm de SEAP expresado a partir del transgén de IL-8/SEAP mediante análisis Northern. Los incrementos en la actividad de SEAP, medida mediante quimioluminiscencia, y el ARNm de SEAP, determinado mediante transferencia Northern, se comparan con los incrementos en ARNm de IL-8 para determinar si la expresión de la SEAP informadora refleja de manera precisa la inducción de IL-8 en respuesta a irritantes.

30

35

[0177] La expresión del ARNm de IL-8 incrementa de 7 a 40 veces después de 24 horas de exposición a varios irritantes de piel (de Brugerolle de Fraissinette et al., supra). La construcción informadora se establece como inducible por irritante si el nivel de actividad de SEAP y el incremento de ARNm es de por lo menos 5 veces en cultivos tratados con irritante.

40

[0178] Si se incrementa la actividad de SEAP en células NIKS transfectadas después de la exposición a irritante, se generan líneas celulares estables con la construcción informadora de IL-8/SEAP de la siguiente manera. Las células NIKS se cotransfectan con la construcción informadora de IL-8/SAP y un plásmido que confiere resistencia a blasticidina (pCMV/bsd Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células transfectadas se desarrollan en presencia de blasticidina para seleccionar células transfectadas de manera estable. Se examinan los clones individuales de células transfectadas por la expresión del gen informador de IL-8/SAP en respuesta a los irritantes. Se utilizan clones que muestran una expresión de transgén inducible por irritante para generar cultivos de piel organotípicos. Estos cultivos se examinan por la sensibilidad a irritante mediante la aplicación tópica de SDS, ácido trans-retinoico y controles negativos (agua, aceite mineral) tal como se ha descrito anteriormente. Los cultivos organotípicos también se pueden alterar mecánicamente, lisar en un tampón que contiene un detergente no iónico, y analizarse la actividad de SEAP.

45

50

55

[0179] Debido a que el fragmento de 1,5 kb de la región reguladora de IL-8 puede no contener todos los elementos reguladores necesarios para la sensibilidad completa, es posible que la magnitud de la respuesta del gen informador pueda ser inferior a la observada con el gen de IL-8 endógeno. Si este fragmento es insuficiente para dirigir la expresión de SEAP específica de irritante, se utiliza el producto PCR como sonda para cribar una biblioteca de ADN genómico. Esta estrategia permite recuperar fragmentos de ADN más grandes que probablemente contienen más de la región reguladora de IL-8. Estos fragmentos de ADN se caracterizan mediante un mapa de restricción y análisis de secuencia. Los fragmentos de ADN que contienen entre 5 y 10 kb de ADN genómico que flanquea el promotor de IL-8 se clonan en el vector pSEAP y se examina por la capacidad de dirigir la expresión de SEAP inducible por irritante tal como se describe anteriormente.

60

65

[0180] También se generan construcciones génicas informadoras alternativas utilizando un fragmento de ADN que

contiene la región reguladora de otra citoquina inducible por irritante, IL-1 α . Las secuencias publicadas para este gen incluyen 1437 pb de ADN en dirección 5' desde el sitio de inicio de la transcripción (Furutani et al., Nuc. Acid Res. 14:3167 [1986]). Se ha utilizado un fragmento de ADN que contiene estas secuencias para dirigir la expresión de un gen informador de CAT en respuesta a transactivadores virales (Mori y Prager, Blood 87:3410 [1996]). Este fragmento contiene dos sitios de unión a NF- κ B, un factor de transcripción que está implicado en los cambios de expresión génica en respuesta a irritantes de la piel (Corsini et al., J. Invest Dermatol. 108:892 [1997]).

[0181] Adicionalmente, también se genera una construcción génica informadora de la línea celular mediante la introducción de una construcción génica informadora en el locus de IL-8 endógeno en células NIKS. Esta estrategia "knocked-in" se ha utilizado para reproducir con precisión una expresión correcta temporal y espacial de genes informadores (Elefanty et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 95:11897 [1998]; Morrison et al., Mech Dev, 1999. 84169 [1999]; Jin et al., Biochem Biophys Res Commun, 270:978 [2000]).

Ejemplo 5

Identificación de genes sensibles a irritantes

[0182] Este ejemplo describe experimentos útiles para la identificación de nuevos genes cuya expresión se induce mediante la exposición a irritante. Se utilizan micromatrices de ADNc de Genome Systems (micromatrices de GEM; Incyte Genomics, Palo Alto, California) para el análisis de la expresión génica. Todas las manipulaciones se realizan por Incyte Genomics. Se utiliza la micromatriz UniGEM V 2.0, construida a partir de la secuencia de Incyte que verificó los clones de ADNc y que contenía 8514 ADNc humanos únicos. Se utilizan matrices más grandes si están disponibles. Se preparan cultivos de equivalentes de piel in vitro utilizando queratinocitos humanos cultivados de donantes adultos agrupados (disponibles de Clonetics, Walkersville, MD). Los queratinocitos cultivados se siembran sobre un equivalente dérmico que consiste en fibroblastos dérmicos incluidos en una matriz de colágeno contraída y el cultivo organotípico resultante se levanta a la interfase con aire para inducir la diferenciación y estratificación de la capa de queratinocitos. Después de 14 días, los cultivos organotípicos se tratan tópicamente con irritantes conocidos (por ejemplo, SDS al 0,2%, calcipotriol al 0,005%, ácido trans-retinoico al 0,025%) o controles no irritantes (por ejemplo, aceite mineral, vaselina) durante 24 horas. Estos compuestos inducen todos la expresión y secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 α e IL-8 en equivalentes de piel tratados con irritante (de Brugerolle de Fraissinette et al., supra).

[0183] La purificación de ARNm de cultivos organotípicos se lleva a cabo utilizando procedimientos conocidos. La capa epidérmica de los cultivos organotípicos de control y expuestos a irritante se desplazan mecánicamente del equivalente dérmico de colágeno y se colocan en reactivo Trizol (Life Technologies, Rockville, MD) durante 1 hora. Después de una agitación intensa periódica y pipeteo para separar el tejido, se separa el ARN de la proteína celular y el ADN mediante extracción con fenolcloroformo. La fase acuosa de esta extracción se trata a continuación con etanol para precipitar el ARN total. Se aísla ARNm de poli A+ del ARN celular total utilizando el sistema de purificación de ARNm de Oligotex (Qiagen, Valencia, CA).

[0184] Para verificar que los cultivos tratados muestran una respuesta a irritante, se examinan cantidades iguales de ARNm de cultivos de control y tratados con irritante mediante transferencia Northern para la inducción de los genes sensibles a irritantes conocidos IL-1 α e IL-8. El ARN de cultivos que muestran inducción de la expresión de IL-1 α e IL-8 se comparan con ARN de cultivos de control mediante perfil de expresión de genes para identificar nuevos genes sensibles a irritante. El ARNm purificado se disuelve en tampón TE a una concentración de 50 ng/ml y se transporta a Incyte Genomics para el análisis con micromatriz de ADNc. El análisis de datos se realiza utilizando el software GEMTools de Genome Systems y los programas de análisis en cluster disponibles del MIT Center for Genome Research y el laboratorio de Patrick O. Brown en la Stanford University.

[0185] Los genes identificados como sensibles a irritante se utilizan en ensayos de genes informadores utilizando los métodos descritos en el ejemplo 4 anterior.

Ejemplo 6

Contenido lipídico de equivalentes de piel

[0186] Este ejemplo describe la preparación de equivalentes de piel con un medio libre de suero optimizado y un segundo grupo de equivalentes de piel preparados con un medio subóptimo. Posteriormente, se determinó el contenido de lípidos de los cultivos resultantes.

[0187] Los cultivos organotípicos se iniciaron mediante el emplacado de 350.000 células NIKS sobre equivalentes dérmicos preparados previamente en un inserto MILLICELL de 10 mm. El medio utilizado para completar esta etapa estaba comprendido de un medio base [mezcla 3:1 de medio F12 de Ham/medio de Eagle modificado por Dulbecco (DME), complementado con 24 μ g/ml de adenina, 8,3 ng/ml de toxina del cólera, 5 μ g/ml de insulina, 0,4 μ g/ml de hidrocortisona, con la concentración final de calcio ajustada hasta 1,88 mM] complementado con Clon Fetal II al 0,2% (un sustituto de suero de ternera).

[0188] Dos días después del emplacado, se suministraron los cultivos organotípicos con medio fresco para mantener el crecimiento. Los cultivos se suministraron con medio base complementado con Clon Fetal II al 0,2% o medio base complementado con Clon Fetal II al 0,2% y constituyentes adicionales (1 mg/ml de BSA libre de endotoxinas, 1 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 1 µM de isoproterenol, 10 µM de carnitina, 10 µM de serina, 25 µM de ácido oleico, 15 µM de ácido linoleico, 7 µM de ácido araquidónico y 1 µM de α-tocoferol).

[0189] Cuatro días después del levantamiento ("lifting"), y cada dos días para el resto del periodo de cultivo, los cultivos se suministraron con un medio óptimo (medio base complementado con 1 mg/ml de BSA libre de endotoxina, 1 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 1 µM de isoproterenol, 10 µM de carnitina, 10 µM de serina, 25 µM de ácido oleico, 15 µM de ácido linoleico, 7 µM de ácido araquidónico y 1 µM de α-tocoferol) o un medio subóptimo (medio base complementado con 1 mg/ml de BSA libre de endotoxina, 1 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 10 µM de carnitina y 10 µM de serina).

[0190] Al completar el periodo de cultivo, se extrajeron los lípidos totales de los cultivos y se separaron mediante cromatografía de capa fina de rendimiento elevado (HPTLC). Después de la separación, las placas se carbonizaron y se rastrearon los cromatogramas resultantes mediante densitometría para cuantificar especies de lípidos individuales. Los cultivos desarrollados en medio de cultivo optimizado contenían un mayor porcentaje de ceramidas totales que los cultivos desarrollados en medio subóptimo (tabla 3). Además, los cultivos desarrollados en medio óptimo contenían niveles mucho más elevados de las ceramidas polares 3, 4, 5, y 6 que los cultivos desarrollados bajo condiciones subóptimas.

	Medio óptimo	Medio subóptimo
Cer 6II		0,07%
Car 6I	0,41%	0,03%
Cer 4/5	1,31%	0,46%
Cer 3	1,37%	0,44%
Cer 2	2,09%	1,69%
Cer 1	1,33%	0,42%
Ceramida total	6,52%	3,11%

Ejemplo 7

Expresión de GKLF en células NIKS

[0191] Este ejemplo describe la expresión en células NIKS de GKLF, una proteína pensada para mediar en el desarrollo de la función de barrera en ratones.

[0192] El ADN que codifica la proteína GKLF se aisló mediante PCR y se clonó en un vector de expresión que contenía el promotor de involucrina humana. Después de la verificación de los fragmentos de GKLF e involucrina mediante secuenciación de ADN, se introdujeron construcciones en células NIKS mediante transfección. Veinticuatro horas después de la transfección, se aisló el ARN total de las células transfectadas y se examinó la expresión de GKLF en estas células mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

[0193] Se detectó un producto PCR correspondiente a ARNm de GKLF empalmado en ARN de células transfectadas con la construcción de involucrina/GKLF, pero no en ARN de control de células transfectadas con un vector vacío. Además, el producto PCR de GKLF no se detectó en reacciones de las que se omitió la transcriptasa inversa. Estos resultados demuestran que se expresó el ARNm de GKLF en células NIKS transfectadas.

[0194] En un segundo grupo de experimentos, se clonó el ADN que codificaba GKLF en el vector pTRE2, el cual permitía la expresión inducible de GKLF después de la adición de doxociclina. Después de la verificación de los fragmentos de GKLF e involucrina mediante secuenciación de ADN, las construcciones se introdujeron en células NIKS mediante transfección. Ocho horas después de la transfección, se añade doxociclina a la mitad de los cultivos transfectados y todos los cultivos se incubaron durante 16 horas adicionales. Veinticuatro horas después de la transfección, se aisló el ARN total de las células transfectadas y se examinó la expresión de GKLF en estas células mediante PCR de transcripción inversa (RT-PCR). Se observó un producto PCR correspondiente a ARNm de GKLF empalmado en muestras con y sin doxociclina, pero se observó más producto en muestras después de la adición de doxociclina. No se detectaron productos PCR en reacciones de las que se omitió la transcriptasa inversa. Estos resultados demuestran la expresión inducible de ARNm de GKLF en células NIKS transfectadas.

Ejemplo 8**Métodos de cultivo**

[0195] Este ejemplo describe métodos de cultivo comunes a los siguientes ejemplos.

5 [0196] **Medio.** El proceso de cultivo organotípico utiliza seis medios de cultivo diferentes: medio de células alimentadoras 3T3 (TM); medio de crecimiento de fibroblastos (FM); medio NIKS (NM); medio de emplacado (PM); medio de estratificación A (SMA); y medio de estratificación B (SMB). Se utiliza TM para propagar células 3T3 que actúan como células alimentadoras para células NIKS en cultivo monocapa. TM es una mezcla de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DME, GibcoBRL) complementada con suero de ternera al 10% (Hyclone). FM es una
10 mezcla de medio F-12 de Ham (GibcoBRL) y suero de Clon Fetal II al 10% (Hyclone). Se utiliza NM para desarrollar queratinocitos de NIKS. NM es una mezcla 3:1 de medio F-12 de Ham (GibcoBRL) y DME complementado con Clon Fetal II al 2,5% (Hyclone), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Calbiochem), 8,4 ng/ml de toxina de cólera (ICN), 5 µg/ml de insulina (GibcoBRL), 24 µg/ml de adenina (Sigma) y 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF, R&D systems). PM es el medio utilizando cuando se siembran células NIKS sobre un equivalente dérmico. PM es el mismo que NM excepto que se extrae GF, se complementa con CaCl₂ (Sigma) hasta una concentración final de calcio de 1,88 mM, y se añade sólo suero de Clon Fetal II al 0,2%. SMA es el mismo que PM con la adición de 1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 1 µM de isoproterenol, 10 µM de carnitina, 10 µM de serina, 25 µM de ácido oleico, 15 µM de ácido linoleico, 7 µM de ácido araquidónico, 1 µM de α-tocoferol, 0,05 mg/ml de ácido ascórbico (todos de Sigma), y 1 ng/ml de EGF. SMB se utiliza durante la fase de estratificación epidérmica del crecimiento del equivalente de piel STRATATEST y equivalente de piel STRATAGRAFT. SMB es el mismo que SMA, pero sin la presencia del complemento de suero de Clon Fetal II.

[0197] **Preparación de alimentadoras.** Antes del inicio de los cultivos organotípicos del equivalente de piel STRATATEST o el equivalente de piel STRATAGRAFT, se preparan células alimentadoras 3T3 y, a continuación, se
25 utilizan frescas o congeladas para el uso posterior. Las células 3T3 se desarrollan hasta la confluencia y se tratan con mitomicina-C (4 µg/ml de mitomicina-C en TM, Roche) durante dos horas. A continuación, las células se lavan, resuspenden y emplacan a una densidad de $1,25 \times 10^5$ por placa de cultivo de tejido de 100 mm para soportar el crecimiento de NIKS. Si se utilizan alimentadores congelados, se descongela una única ampolla congelada que contiene 1 ml con $2,5 \times 10^6$, se diluye con TM fresco y se emplaca sobre una o más placas de cultivo de tejido de 100 mm. Esto se realiza para tantas placas como sea necesario para el crecimiento de células NIKS un día antes de emplacar las células NIKS.

[0198] **Preparación del equivalente dérmico.** Se descongelan y emplacan células NHDF congeladas. Las células se alimentan con FM el día siguiente para eliminar el crioprotector residual y posteriormente mantener el crecimiento celular. Las células NHDF preconfluentes se recogen para utilizar en el equivalente dérmico. Para preparar el
35 equivalente dérmico, se diluye primero el colágeno de tendón de cola de rata (Tipo I, Becton-Dickinson) hasta 3 mg/ml en ácido acético 0,03N y se enfría en hielo. Se mezcla una mezcla de medio F12 de Ham concentrado (8,7X fuerza normal, tamponado con HEPES a pH 7,5) con Clon Fetal II. Estas dos soluciones son 11,5 y 10% del volumen de solución final. Se añade NaOH 1 N a la mezcla del medio (2,5% de la solución final). El colágeno diluido (74%) se añade a continuación a la mezcla. A la mezcla se añade un 2% en volumen de fibroblastos suspendidos ($2,5 \times 10^6$ células/ml para el equivalente dérmico de STRATATEST y 1×10^6 para el equivalente dérmico de STRATAGRAFT). La solución se mezcla suavemente, pero no intensamente. Se coge una alícuota de 100 µl en los insertos de cultivo de tejido (MILLICELL de Millipore Corp.), se colocan 25 en una placa de cultivo de tejido de 100 mm para STRATATEST. El equivalente de piel STRATAGRAFT utiliza los insertos TRANSWELL de Corning. Se vierte un equivalente dérmico de 13 ml en cada inserto, haciéndolo aproximadamente tres veces el grosor de un equivalente dérmico de STRATATEST. Después de 30 minutos para la formación de gel, la placa que contiene los equivalentes dérmicos de STRATATEST se baña con 20 ml de FM. Se colocan una o dos gotas de FM en la superficie de cada equivalente dérmico de STRATATEST. Para los equivalentes dérmicos de STRATAGRAFT, se colocan 80 ml de FM alrededor del inserto TRANSWELL en una placa de cultivo de tejido de 150 mm y se colocan 10 ml en la parte superior del equivalente dérmico. Los insertos se colocan en una incubadora a 37°C, CO₂ al 5%, humedad relativa del 90%, hasta su uso. Un día antes de sembrar los equivalentes dérmicos con células NIKS, se levantan hasta la interfase con aire mediante su colocación sobre una malla de acero inoxidable estéril con dos almohadillas absorbentes (S&S Biopath) en la parte superior para suministrar el medio a través de la base del inserto de cultivo de tejido.

55 [0199] **Crecimiento y sembrado de NIKS.** Las alimentadoras se preparan frescas o descongeladas y se emplacan en TM un día antes del emplacado de NIKS. Las células NIKS se emplacan sobre las alimentadoras a una densidad de aproximadamente 3×10^5 células por placa de 100 mm. Si las células NIKS se descongelan de nuevo, se alimentan con NM fresco un día después del emplacado para eliminar el crioprotector residual. Las células NIKS se alimentan con NM para mantener el crecimiento según se requiera. Cuando las células se acercan a la confluencia, las células NIKS se recogen, se cuentan y se resuspenden en PM. Se siembran $4,65 \times 10^5$ células NIKS/cm² sobre la superficie de los equivalentes dérmicos de MILLICELL o TRANSWELL, que se han levantado a la interfase son aire durante un día. Las placas se alimentan con PM para bañarse por debajo del levantador ("lifter") metálico y se vuelven a colocar en la incubadora. Dos días después, los cultivos se alimentan con SMA. Después de dos días
65 adicionales, los cultivos se alimentan con SMB y se transfieren a una incubadora con 75% de humedad, donde

permanecen, mantenidos con alimentaciones adicionales de SMB, hasta su maduración.

Ejemplo 9

5 **[0200]** Este ejemplo describe la preparación de equivalentes dérmicos utilizando colágeno 1 mg/ml. Brevemente, se mezclaron 24 ml de medio F12 de Ham preparado a una concentración 10X con 4,8 ml de H₂O estéril, 2,4 ml de una mezcla de penicilina/estreptomicina y 24 ml de Clon Fetal II en un tubo cónico de 50 ml. Se diluyó colágeno de tendón de cola de rata del Tipo I (1,46 ml) a 4,11 mg/ml con 1,881 ml de H₂O estéril y 2,658 ml de ácido acético al 0,05%. Se recogieron fibroblastos dérmicos humanos normales del cultivo y se resuspendieron a una densidad celular de 10⁶ y 10⁴ células/ml. Se combinaron 0,815 ml de la mezcla que contenía el medio con 2,619 ml de colágeno diluido y 34 µl de fibroblatos a 10⁴ células/ml. Se tomaron alícuotas de 116,5 µl de esta mezcla en insertos de cultivo de tejido (25 de los cuales en una placa de Petri) y se dejaron gelificar durante 15 minutos a 37°C. Se combinaron 0,815 ml adicionales de la mezcla que contenía medio con otros 2,619 ml de colágeno diluido y 137 µl de fibroblastos a 10⁶ células/ml. Se tomaron alícuotas de 116,5 µl de esta mezcla en los insertos de cultivo de tejido en la parte superior del gel previo y se dejaron gelificar durante 30 minutos.

20 **[0201]** A continuación, la placa de petri se bañó con 20 ml de medio FM y se incubó durante 5 días. A continuación, se extrajo el FM y se aspiró el líquido de las superficies de los equivalentes dérmicos. Las células NIKS se recogieron utilizando procedimientos estándar, se resuspendieron a 2,345x10⁶ células/ml en medio de emplacado (PM). Se pusieron 150 µl de esta suspensión en la superficie de cada equivalente dérmico y se dejaron incubar durante 2 horas. A continuación, los equivalentes dérmicos sembrados se bañaron con 20 ml de PM. Después de dos días, los cultivos sumergidos se realimentaron con PM.

25 **[0202]** Después de dos días más, se extrajo el medio de la placa de petri, así como de la superficie de los cultivos. Los cultivos se airearon y se alimentaron con aproximadamente 30 ml de PM complementado hasta suero al 2% cada 2 días. Los cultivos se analizaron 14 días después de sembrarse. Ninguno de los cultivos presentaba un cubrimiento epidérmico completo del equivalente dérmico. De este modo, no fueron adecuados para la aplicación comercial.

30 Ejemplo 10

[0203] Este ejemplo describe la preparación de equivalentes dérmicos utilizando colágeno 3 mg/ml. Se mezclaron 4,785 ml de medio F12 de Ham preparado a una concentración 10X con 0,946 ml de H₂O estéril, 0,473 ml de una mezcla de penicilina/estreptomicina, y 4,785 ml de Clon Fetal II en un tubo cónico de 50 ml. Se mezclaron 4,6 ml de esta mezcla de medio con 0,242 ml de H₂O estéril y 0,289 ml de NaOH 1 N. Se mezclaron 0,92 ml de la mezcla con 3 ml de colágeno de tendón de cola de rata de Tipo I a 3,11 mg/ml. A ésta se le añadieron 186 ml de una suspensión de fibroblastos dérmicos humanos a 10⁶ células/ml. Se colocaron 100 ml de esta mezcla en los insertos MILLICELL (diámetro de 1 cm) y se dejaron gelificar durante 30 minutos. A continuación, la placa de petri se bañó con 20 ml de medio FM y se dejó incubar. Después de 5 días, se extrajo el FM y se aspiró el líquido de las superficies de los equivalentes dérmicos. Se recogieron las células NIKS™ utilizando procedimientos estándar, se resuspendieron a 2,345x10⁶ células/ml en medio de emplacado (PM). Se colocaron 150 µl de esta suspensión en la superficie de cada dermis y se dejaron incubar durante 2 horas. Los equivalentes dérmicos sembrados se bañaron a continuación con 20 ml de PM. Después de dos días más, se extrajo el medio de la placa de petri (incluyendo la superficie de los cultivos) y los cultivos se levantaron a la interfase con aire y se alimentaron con aproximadamente 30 ml del medio de estratificación cada 2 días. Los cultivos se analizaron 14 días después de sembrarse. Al completar el crecimiento del cultivo, todos los cultivos presentaban un cubrimiento completo del equivalente dérmico con epidermis y presentaban un aspecto liso y seco. De este modo, fueron muy aceptables para la aplicación comercial.

Ejemplo 11

50 **[0204]** Este ejemplo de muestra los efectos beneficiosos del prelevantamiento ("prelifting") del equivalente dérmico antes de sembrar con queratinocitos. Se mezclaron 1,31 ml de medio F12 de Ham preparado a una concentración 110X con 0,328 ml de H₂O estéril, 0,148 ml de una mezcla de penicilina/estreptomicina y 1,472 ml de Clon Fetal II en un tubo cónico de 50 ml y se dividieron 1,63 ml (~mitad) en un segundo tubo. Se mezclaron 2,92 ml de colágeno de tendón de cola de rata (4,11 mg/ml) con 3,764 ml de H₂O estéril y 5,316 ml de ácido acético al 0,05% para producir colágeno 1 mg/ml en ácido acético al 0,05%. Se añadieron 5,24 ml de colágeno diluido a 1,63 ml de la mezcla de medio. Se añadieron y mezclaron suavemente 74 µl de células de fibroblastos dérmicos humanos con protocolos estándar a una densidad celular de 10⁴ células/ml. Se tomaron alícuotas de 116,5 ml de esta mezcla en insertos de cultivo de tejido (25 a una placa de Petri) y se dejaron gelificar durante 15 minutos a 37°C. Se añadieron otros 5,24 ml de colágeno a los segundos 1,63 ml de la mezcla de medio junto con 274 µl de fibroblastos a 10⁶ células/ml. Se añadieron 116,55 µl a cada inserto en la parte superior de la primera capa de colágeno gelificado. Se dejó gelificar durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se bañaron las placas de petri con 20 ml de FM, de manera que los equivalentes dérmicos se podían sumergir maduros en el medio. Después de cuatro días, se extrajo el medio de la placa de petri (incluyendo de la superficie de los cultivos) y los cultivos se levantaron a la interfase con aire y se alimentaron con aproximadamente 30 ml de FM. Los cultivos se dejaron en la incubadora en este estado durante la

noche. A continuación, se sembraron con 150 µl de queratinocitos NIKS recogidos del cultivo en monocapa utilizando protocolos estándar a una densidad celular de $2,345 \times 10^6$ células/ml. Después de sembrar, los cultivos se alimentaron con PM y se devolvieron a la incubadora. Dos días después, los cultivos se alimentaron con SMA y cada dos días los cultivos se alimentaron con SMB durante un total de ocho alimentaciones. Al completar el crecimiento del cultivo, todos los cultivos presentaban un cubrimiento completo del equivalente dérmico con epidermis y presentaban un aspecto liso y seco. La histología reveló que las muestras prelevantadas tenían aproximadamente el mismo grosor que la dermis y la epidermis, y todas las capas estratificadas estaban presentes en la epidermis.

Ejemplo 12

[0205] Este ejemplo describe el efecto de prelevantamiento para toda la vida del equivalente dérmico. Se prepararon cultivos exactamente como en el experimento satisfactorio indicado anteriormente, con la excepción de que no se sumergieron. Los geles se vertieron con los insertos de MILLICELL levantados a la interfase con aire y los posteriores sembrado y alimentación tuvieron lugar con los cultivos levantados. Al completar el crecimiento del cultivo, uno de diez de los cultivos presentó un cubrimiento completo del equivalente dérmico con epidermis. Este efecto es aparentemente debido, en parte, a la poca adherencia del equivalente dérmico a la base del inserto de MILLICELL, ya que el equivalente dérmico se había separado de los laterales en la mayoría de muestras. La histología indicó que el grosor de las capas dérmica y epidérmica era muy variable. Asimismo, la estratificación epidérmica variaba desde bien diferenciada a sólo cubrimiento en monocapa que no era aceptable para el uso comercial.

Ejemplo 13

[0206] Este ejemplo describe la optimización de un medio libre de suero que apoya la total estratificación de queratinocitos en cultivo organotípico que también da lugar a equivalentes de piel con una función de barrera mejorada.

[0207] Se iniciaron los cultivos organotípicos mediante el emplacado de 350.000 células NIKS sobre un equivalente epidérmico preparado previamente en un inserto MILLICELL de 10 mm. El medio utilizado para completar esta etapa estaba comprendido de un medio base (mezcla 3:1 de medio F12 de Ham/medio Eagle modificado por Dulbecco (DME), complementado con 24 µg/ml de adenina, 8,3 ng/ml de toxina de cólera, 5 µg/ml de insulina, 0,4 µg/ml de hidrocortisona, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, con concentración final de calcio ajustada hasta 1,88 mM a través de la adición de CaCl_2) complementado con Clon Fetal II al 0,2%.

[0208] Dos días después del emplacado, se suministraron los cultivos organotípicos con medio fresco para mantener el crecimiento. Los cultivos se suministraron con medio base complementado con Clon Fetal II al 0,2% o medio base con constituyentes adicionales (albúmina de suero bovino bajo en endotoxinas 1 mg/ml, factor de crecimiento epidérmico 1 ng/ml, isoproterenol 1 µM, carnitina 10 µM, serina 10 µM, ácido oleico 25 µM, ácido linoleico 15 µM, ácido araquidónico 7 µM, α-tocoferol µM, y ácido ascórbico 0,05 mg/ml) complementado con Clon Fetal II al 0,2%.

[0209] Cuatro días después del emplacado, y para el resto del experimento, los cultivos organotípicos se suministraron con una de seis formulaciones de medios. Los cultivos que habían recibido previamente medio base complementado con Clon Fetal al 0,2% se suministraron con medio base sin complemento de Clon Fetal II, o medio base complementado con Clon Fetal II al 0,2%, o medio base complementado con Clon Fetal II al 2%. Los cultivos que habían recibido previamente medio base con constituyentes adicionales complementado con Clon Fetal II al 0,2%, se suministraron con medio base con constituyentes adicionales sin complemento de Clon Fetal II o medio base con constituyentes adicionales complementados con Clon Fetal al 0,2%, o medio base con constituyentes adicionales complementados con Clon Fetal II al 2%.

[0210] Se utilizaron tres criterios para evaluar el impacto de las formulaciones de los medios. Se utilizó la inspección visual para determinar el grado de cubrimiento de la superficie celular contigua. Las lecturas de la medición de la impedancia se utilizaron para medir la función de barrera resultante de los cultivos. La viabilidad de la exposición posterior del tejido a SDS al 0,1% se utilizó como una evaluación práctica de la función de barrera. Para todos los criterios, los cultivos organotípicos mantenidos en medio base con constituyentes adicionales tuvo un mejor rendimiento que el medio base sin constituyentes adicionales. La exclusión de suero no dificultaba la acción de los cultivos organotípicos, siempre que se suministraran constituyentes adicionales.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0211]

<110> Comer, Allen
Allen-Hoffmann, Lynn
Hoffmann, Michael

<120> Sustitutos de piel mejorados y usos de los mismos

<130> Strata-07021 -

ES 2 457 092 T3

<160> 3
 <170> PatentIn version 3.0
 <210> 1
 <211> 2908
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 1

5

10 gacgccaaga gagcgagcgc ggctccgggc gcgcggggag cagaggcggg ggcgggcggc 60

 gggggcacc c ggagccgcg agtgcccctc cccgcccctc cagccccca cccaggaacc 120

15 cgcccgtgac ccgcgcccac ggccgcgcgc acccgggtaca gtccccagga ctccgcacc 180

 cgcgccaccg tccagctcgc agttccgcgc caccgcggcc attctcacct ggcggcgccg 240

20 cccgccaccg cccggaccac agccccgcg ccgccgacag ccacagtggc cgcgacaacg 300

 gtgggggaca ctgctgagtc caagagcgtg cagcctggcc atcggacctt cttatctgcc 360

 ttgctgattg tctatcttta taagagttta caactcttct aagaattttt gtatacaaag 420

25 gaactctttt taaagacatc gccggtttat attgaatcca aagaagaagg atctcgggca 480

 atctgggggt tttggttga ggttttgttt ctaaagtctt taatcttcgt tgactttggg 540

30 gctcaggtag ccctctctct tcttcggact ccggaggacc ttctgggccc ccacattaat 600

 gaggcagcca cctggcgagt ctgacatggc tgtcagcgac gctctgctcc cgtccttctc 660

35 cacgttcgcg tccggcccgg cgggaagggg gaagacactg cgtccagcag gtgccccgac 720

 taaccgttgg cgtgaggaac tctctcacat gaagcgactt cccccacttc ccggccgccc 780

 ctacgacctg gcggcgacgg tggccacaga cctggagagt ggcggagctg gtgcagcttg 840

40 cagcagtaac aaccggccc tcctagcccg gagggagacc gaggagtca acgacctcct 900

 ggacctagac tttatccttt ccaactcgtt aaccaccag gaatcgggtg ccgccaccgt 960

45 gaccacctcg gcgtcagctt catcctcgtc ttccccggcg agcagcggcc ctgccagcgc 1020

 gccctccacc tgcagcttca gctatccgat ccgggcccgg ggtgaccggc gcgtggctgc 1080

50 cagaaacaca ggtggagggc tcctctacag ccgagaatct gcgccacctc ccacggcccc 1140

55

60

65

ES 2 457 092 T3

cttcaacctg ggggacatca atgacgtgag cccctcgggc ggcttcgtgg ctgagctcct 1200
 gcggccggag ttggaccag tatacattcc gccacagcag cctcagccgc caggtggggg 1260
 gctgatgggc aagtttgtgc tgaaggcgtc tctgaccacc cctggcagcg agtacagcag 1320
 5 cccttcggtc atcagtgtta gcaaaggaag cccagacggc agccaccccg tggtagtgge 1380
 gccctacagc ggtggcccgc cgcgcatgtg ccccaagatt aagcaagagg cgggtcccgc 1440
 10 ctgcacggtc agccgggtccc tagaggccca tttgagcgct ggaccccagc tcagcaacgg 1500
 ccaccggccc aacacacacg acttccccct ggggcggcag ctccccacca ggactacccc 1560
 15 tacactgagt cccgaggaac tgctgaacag cagggactgt caccctggcc tgcctcttcc 1620
 cccaggatc catccccatc cgggggcca ctaccctcct ttctgccag accagatgca 1680
 gtcacaagtc ccctctctcc attatcaaga gctcatgcca ccgggttct gctgccaga 1740
 20 ggagcccaag ccaaagagg gaagaaggc gtggccccg aaaagaacag ccaccacac 1800
 ttgtgactat gcaggctgtg gcaaaccta taccaagagt tctcatctca aggcacact 1860
 25 gogaactcac acaggcgaga aaccttacca ctgtgactgg gacggctgtg ggtggaaatt 1920
 cgcccgtcc gatgaactga ccaggcacta ccgcaaacac acagggcacc ggcccttca 1980
 30 gtgccagaag tgtgacagg ccttttccag gtcggaccac cttgccttac acatgaagag 2040
 gcacttttaa atcccacgta gtggatgtga cccacactgc caggagagag agttcagtat 2100
 tttttttct aacctttcac actgtcttcc cacgagggga ggagcccagc tggcaagcgc 2160
 35 tacaatcatg gtcaagttcc cagcaagtca gcttgtgaat ggataatcag gagaaaggaa 2220
 gagtccaaga gacaaaacag aaatactaaa aacaaaacaaa caaaaaaaca aacaaaaaaa 2280
 40 ccaagaaaaa aaaatcacag aacagatggg gtctgatact ggatggatct tctatcattc 2340
 caataccaaa tccaacttga acatgcccg acttacaaaa tgccaagggg tgactggaag 2400
 45 tttgtggata tcagggtata cactaaatca gtgagcttgg ggggagggaa gaccaggatt 2460
 cccttgaatt gtgtttcgat gatgcaatac acacgtaaag atcaccttgt atgctctttg 2520
 50 ccttcttaa aaaaaaagc cattattgtg tcggaggaag aggaagcgat tcaggtacag 2580
 aacatgttct aacagcctaa atgatggtgc ttggtgagtt gtggtcctaa aggtacaaa 2640
 cgggggagcc aaagtctcc aactgctgca tacttttgac aaggaaaatc tagttttgtc 2700
 55 ttccgatcta cattgatgac ctaagccagg taaataagcc tggtttattt ctgtaacatt 2760
 tttatgcaga cagtctgtta tgcactgtgg tttcagatgt gcaataattt gtacaatggt 2820
 60 ttattcccaa gtatgccttt aagcagaaca aatgtgtttt tctatatagt tccttgcctt 2880
 aataaatatg taatataaat ttaacca 2908

65

ES 2 457 092 T3

5 <210> 2
 <211> 2639
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

10 tcgaggcgac cgcgacagtg gtgggggacg ctgctgagtg gaagagagcg cagcccggcc 60
 accggaccta cttactcgcc ttgctgattg tctatTTTTg cgtttacaac ttttctaaga 120
 15 acttttgtat acaaaggaac tttttaaaaa agacgcttcc aagttatatt taatccaaag 180
 aagaaggatc tcggccaatt tggggTTTTg ggTTTTggct tcgTTTcttc tcttcgTTga 240
 20 ctttgggggtt caggtgcccc agctgcttcg ggctgccgag gaccttctgg gccccacat 300
 taatgaggca gccacctggc gagtctgaca tggctgtcag cgacgcgctg ctcccatctt 360
 25 tctccacggt cgcgctctggc ccggcgggaa gggagaagac actgcgtcaa gcaggtgccc 420
 cgaataaccg ctggcgggag gagctctccc acatgaagcg acttccccca gtgcttcccg 480
 gccgccccta tgacctggcg gcggcgaccg tggccacaga cctggagagc ggccggagccg 540
 30 gtgcggcttg cggcggtagc aacctggcgc ccctacctcg gagagagacc gaggagtcca 600
 acgatctctt ggacctggac tttattctct ccaattcget gacctatcct ccggagtcag 660
 35 tggccgccac cgtgtcctcg tcagcgtcag cctcctcttc gtcgtcgccg tcgagcagcg 720
 gccctgccag cgcgcctccc acctgcagct tcacctatcc gatccgggccc gggaaacgacc 780
 40 cgggcgtggc gccggggggc acgggcggag gcctcctcta tggcagggag tccgctcccc 840
 ctccgacggc tcccttcaac ctggcggaca tcaacgacgt gagcccctcg ggccggcttcg 900
 45 tggccgagct cctgcggcca gaattggacc cgggtgtacat tccgccgcag cagccgcagc 960
 cgccaggtgg cgggctgatg ggcaagttcg tgctgaaggc gtcgctgagc gccctggca 1020
 50 gcgagtacgg cagcccgtcg gtcacagcg tcagcaaagg cagccctgac ggcagccacc 1080
 cggtggtggt ggcgccttac aacggcgggc cgcgcgcac gtgccccaaag atcaagcagc 1140
 aggcggtctc ttcgtgcacc cacttgggcg ctggaccccc tctcagcaat ggccaccggc 1200
 55 cggtgcaca cgacttcccc ctggggcggc agctccccag caggactacc ccgacctgg 1260
 gtcttgagga agtgctgagc agcagggact gtcaccctgc cctgccgctt cctcccggct 1320
 60 tccatccccca cccggggccc aattacccat ccttctgccc cgatcagatg cagccgcaag 1380

65

ES 2 457 092 T3

5 tcccgccgct ccattaccaa gagctcatgc caccgggttc ctgcatgcca gaggagccca 1440
 agccaaagag gggagacga tcgtggcccc ggaaaaggac cgccaccac acttgtgatt 1500
 10 acgcgggctg cggcaaaacc tacacaaaga gttcccatct caaggcacac ctgcgaaccc 1560
 acacaggtga gaaaccttac cactgtgact gggacggctg tggatggaaa ttcgccgct 1620
 cagatgaact gaccaggcac taccgtaaac acacggggca cgcgccgttc cagtgcctaaa 1680
 15 aatgcgaccg agcattttcc aggtcggacc acctcgctt acacatgaag aggcatTTTT 1740
 aaatcccaga cagtggatat gaccacact gccagaagag aattcagtat tttttacttt 1800
 20 tcacactgtc ttcccgatga gggagggagc ccagccagaa agcactacaa tcatggtcaa 1860
 gttcccaact gagtcatctt gtgagtggat aatcaggaaa aatgaggaat ccaaagaca 1920
 25 aaaatcaaag aacagatggg gtctgtgact ggatcttcta tcattccaat tctaaatccg 1980
 acttgaatat tcctggactt acaaaatgcc aaggggggtga ctggaagttg tggatatcag 2040
 30 ggtataaatt atatccgtga gttgggggag ggaagaccag aattcccttg aatttgttat 2100
 tgatgcaata taagcataaa agatcacctt gtattctctt taccttctaa aagccattat 2160
 tatgatgtta gaagaagagg aagaaattca ggtacagaaa acatgtttaa atagcctaaa 2220
 35 tgatggtgct tggtagtct tggttctaaa ggtaccaaac aaggaagcca aagttttcaa 2280
 actgctgcat actttgacaa ggaaaatcta tatttgtctt ccgatcaaca tttatgacct 2340
 40 aagtcaggta atatacctgg tttacttctt tagcattttt atgcagacag tctgttatgc 2400
 actgtggttt cagatgtgca ataatttgta caatggttta ttccaagta tgccttaagc 2460
 45 agaacaaatg tgtttttcta tatagttcct tgccttaata aatatgtaat ataaatttaa 2520
 gcaaacgtct attttgata tttgtaaact acaaagtaaa atgaacattt tgtggagttt 2580
 50 gtattttgca tactcaaggt gagaattaag ttttaaataa acctataata ttttatctg 2639

55 <210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sintético
 60 <400> 3
 gagaaggagg cgtggccaac 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende un cultivo humano derivado in vitro de queratinocitos que se ha estratificado en epitelio escamoso (equivalente de piel), teniendo dicho equivalente de piel una capacitancia eléctrica de superficie de 40 a 240 pF, medida como la diferencia en la lectura sobre un intervalo de 10 segundos, y en la que el contenido combinado de las ceramidas 5, 6, y 7 en dicho equivalente de piel es del 20 al 50% del contenido total de ceramida, en la que dichos queratinocitos son Células de Queratinocitos Inmortalizadas Casi Diploides.
- 10 2. Composición, según la reivindicación 1, teniendo dicho equivalente de piel humano una capacitancia eléctrica de superficie de 80 a aproximadamente 120 pF.
3. Composición, según la reivindicación 1 ó 2, en la que el contenido de ceramida 2 en dicho equivalente de piel es de aproximadamente 10 al 40% del contenido total de ceramida.
- 15 4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dichas Células de Queratinocitos Inmortalizadas Casi Diploides una construcción génica informadora sensible a irritante.
- 20 5. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para utilizar en la cicatrización de heridas y/o el tratamiento de quemaduras de un paciente que sufre una herida.

Figura 1. Secuencia de ARNm de Klf4 de ratón (SEQ ID NO: 1)

```

1 gacgccaaga gagcgagcgc ggctccgggc gcgcggggag cagagggcgt ggcgggcggc
 61 gggggcaccg ggagccgcgc agtgcgccctc cccgcgccctc cagcccccca cccaggaacc
121 cgcccgtagc ccgcgcccac ggccgcgcgc acccggtaga gtccccagga ctccgcaccg
181 cgcgccaccg tccagctcgc agttccgcgc caccgcggcc attctcacct ggcgggcggc
241 cccgccaccg cccggaccac agcccccgcg ccgcgcagag ccacagtggc cgcgacaacg
301 gtgggggaca ctgctgagtc caagagcgtg cagcctggcc atcggacctc ctatctgcc
361 ttgctgattg tctatTTTTA taagagTTTA caactTTTTt aagaatTTTT gtatacaaag
421 gaactTTTTt taaagacatc gccggTTTTt attgaatcca aagaagaagg atctcgggca
481 atctgggggt tttggTTTga ggtTTTTgtt ctaaagTTTT taactctcgt tgactTTggg
541 gctcaggtac cctctctctc tcttcggact ccggaggacc ttctggggcc ccacattaat
601 gaggcagcca cctggcgagt ctgacatggc tgtcagcgac gctctgctcc cgtccttctc
661 cacgttcgcg tccggcccgg cgggaagggg gaagacactg cgtccagcag gtgccccgac
721 taaccgttgg cgtgaggaac tctctcacat gaagcgactt cccccacttc cggcgccccc
781 ctacgacctg gcggcgacgg tggccacaga cctggagagt ggcgagctg gtgcagcttg
841 cagcagtaac aaccggcccc tctagcccg gagggagacc gaggagtcca acgacctcct
901 ggacctagac tttatccttt ccaactcgtc aaccaccag gaatcggtag cgcaccagt
961 gaccacctcg gcgtcagctt catctcgtc tccccggcg agcagcgccg ctgccagcgc
1021 gccctccacc tgcagcttca gctatccgat ccgggcccgg ggtgaccogg cgtggcctgc
1081 cagaaacaca ggtggagggc tctctacag ccgagaatct gcgccacctc ccacggcccc
1141 cttcaacctg ggggacatca atgacgtgag cccctcgggc ggctctgtgg ctgagctcct
1201 gcggccggag ttggaccagc tatacattcc gccacagcag cctcagccgc caggtggggg
1261 gctgatgggc aagtttTgtc tgaaggcgtc tctgaccacc cctggcagcg agtacagcag
1321 cctctcggtc atcagtgTta gcaaaggaaG cccagacggc agccaccccc tggtagtggc
1381 gccctacagc ggtggcccgc cgcgcagtgt cccaagatt aagcaagagg cggctccctc
1441 ctgcacggtc agccggctcc tagaggccca tttgagcgtt ggacccccagc tcagcaacgg
1501 ccaccggccc aacacacacg acttccccct ggggcggcag ctccccacca ggactacccc
1561 tacactgagt cccgaggaac tgctgaacag cagggactgt caccctggcc tgcctcttcc
1621 cccaggattc catccccatc cgggggcccA ctaccctcct tctctgccag accagatgca
1681 gtcacaagtc cctctctctc attatcaaga gctcatgcca ccgggttctt gcctgcaga
1741 ggagcccaag ccaaagaggg gaagaaggtc gtggccccgg aaaagaacag ccaccacac
1801 ttgtgactat gcaggctgtg gcaaaacctA taccagagt tctcatctca aggcacacct
1861 gcgaactcac acaggcgaga aaccttacca ctgtgactgg gacggctgtg ggtggaatt
1921 cgcccgctcc gatgaactga ccaggcacta ccgcaaacac acagggcacc ggcccttca
1981 gtgccagaag tgtgacaggg ccttttccag gtccgaccac cttgccttac acatgaagag
2041 gcacttttaa atcccacgta gtggatgtga cccacactgc caggagagag agttcagtat
2101 tttttttctt aacctttcac actgtcttcc caocgaggggA ggagcccagc tggcaagcgc
2161 tacaatcatg gtcaagttcc cagcaagtca gcttgtgaat ggataatcag gagaaaggaa
2221 gagtccaaga gacaaaacag aaatactaaa aacaaaacaaa caaaaaaaca aacaaaaaaa
2281 ccaagaaaaa aaaatcacag aacagatggg gtctgatact ggatggatct tctatcttc
2341 caataccaaa tccaacttga acatgcccgg acttacaAAA tgccaagggg tgactggaag
2401 tttgtggata tcaggtata cactaaatca gtgagcttgg ggggagggaa gaccaggatt
2461 cccttgaatt gtgtttcgat gatgcaatac acacgtaaag atcacctgtt atgctctttg
2521 ccttctttaa aaaaaaaagc cattattgtg tccgaggaag aggaagcgat tcaggtagag
2581 aacatggtct aacagcctaa atgatggTgc ttggtagttt gtggtcctaa aggtaccaa
2641 cgggggagcc aaagtctctc aactgtgca tacttttgac aaggaaaatc tagttttgtc
2701 ttccgatcta cattgatgac ctaagccagg taaataagcc tggtttattt ctgtaacatt
2761 tttatgcaga cagtctgtta tgcactgtgg tttcagatgt gcaataattt gtacaatggg
2821 ttattcccaa gtatgccttt aagcagaaca aatgtgtttt tctatatagt tccttgcctt
2881 aataaatatg taatataaat ttaaccca

```

Figura 2. Secuencia de ADNc para Gklf4 humana (SEQ ID NO: 2)

```

1tcgagggcgac cgcgacagtg gtgggggacg ctgctgagtg gaagagagcg cagcccggcc
61 accggaccta cttactcgcc ttgctgattg tctatTTTTg cgtttacaac ttttctaaga
121 acttttTgat acaaaggaac tttttaaaaa agacgcttcc aagttatatt taatccaaag
181 aagaaggatc tcggccaatt tggggTTTTg ggtttTggct tcgtttcttc tcttcgttga
241 ctttggggTt caggtgcccc agctgcttcg ggctgccgag gaccttctgg gccccacat
301 taatgaggca gccacctggc gagtctgaca tggctgtcag cgacgcgctg ctcccatctt
361 tctccacgTt cgcgtctggc cggcggggaa gggagaagac actgctcaa gcaggtgccc
421 cgaataaccg ctggcgggag gagctctccc acatgaagcg acttccccca gtgcttccccg
481 gccgccccta tgacctggcg gggcgaccg tggccacaga cctggagagc ggcgagccg
541 gtgcggcttg cggcggtagc aacctggcgc cctacctcg gagagagacc gaggagtcca
601 acgatctcct ggacctggac tttattctct ccaattcgct gacctatcct ccggagttag
661 tggccgcccag cgtgtctctc tcagcgtcag cctctcttc gtctgcgctg tcgagcagcg
721 gccctgccag cgcgcctctc acctgcagct tcaacctatc gatccgggac ggaacgacc
781 cgggcgtggc gccggcgggc acggcgggag gcctctctta tggcagggag tccgctcccc
841 ctccgacggc tcccttcaac ctggcggaca tcaacgacgt gagccccctg ggcggtctg
901 tggccgagct cctgcgggca gaattggacc cgggtgacat tccgccgag cagccgcagc
961 cgccaggtgg cgggctgatg ggcaagtTog tgctgaagc gtctgtgagc gcccctggca
1021 gcgagtacgg cagcccgtcg gtcctcagcg tcagcaaagg cagccctgac ggcagccacc
1081 cggtggtggT ggcgcccTac aacggcgggc cgcgcgcac gtgccccaaG atcaagcagg
1141 aggcggTctc ttcgtgcacc cacttggggc ctggaccccc tctcagcaat ggccaccggc
1201 cggctgcaca cgacttcccc ctggggcggc agctccccag caggactacc ccgacctggg
1261 gtcttgagga agtgtctgagc agcagggact gtcaccctgc cctgcccgtt cctcccggct
1321 tccatccccA cccggggccc aattaccat ccttctgccc cgatcagatg cagccgcaag
1381 tcccgcgctc ccattaccaa gagctcatgc cacccggttc ctgcatgcca gaggagccca
1441 agccaaagag gggagacgca tcgtggcccc ggaaaaggac cgcacccac acttgtgatt
1501 acgcgggctg cggcaaaacc tacacaaaga gtccccatct caaggcacac ctgcccagcc
1561 acacaggtga gaaaccttac cactgtgact gggacggctg tggatggaaa ttcgcccgct
1621 cagatgaact gaccaggcac taccgtaaac acacggggca ccgcccgttc cagtgcctaa
1681 aatgcgaccg agcattttcc aggtcggacc acctcgctt acacatgaag aggcattttt
1741 aatcccaga cagtggatat gaccacact gccagaagag aattcagtat ttttactttt
1801 tcacactgtc tcccgatga gggagggagc ccagccagaa agcactaaa tcatggtcaa
1861 gttcccactg gagtcatctt gtgagtggat aatcaggaaa aatgaggaat ccaaagaca
1921 aaaatcaaaG aacagatggg gtctgtgact ggatcttcta tcatccaat tctaaatccg
1981 acttgaatat tcctggactt acaaaatgcc aagggggTga ctggaagtTg tggatatcag
2041 ggtataaatt atatccgtga gttgggggag ggaagaccag aattccctTg aattgtgtat
2101 tgatgcaata taagcataaa agatcacctt gtattctctt taccttctaa aagccattat
2161 tatgatgtta gaagaagagg aagaaattca ggtacagaaa acatgtttaa atagcctaaa
2221 tgatggTgct tggTgagTct tggTtctaaa ggtaccaaac aaggaagcca aagtTtcaa
2281 actgctgcat actttgacaa ggaaaatcta tatttTgctt ccgatcaaca tttatgacct
2341 aagtcaggta atatacctgg tttacttctt tagcattttt atgcagacag tctgttatgc
2401 actgtggTtt cagatgtgca ataatttgta caatggTtta ttcccagta tgccttaagc
2461 agaacaaatg tgttttctta tatagTtctt tgccttaata aatatgtaat ataaatttaa
2521 gcaaacgtct attttgtata tttgtaaact acaaagTaaa atgaacattt tgtggagTtt
2581 gtattttgca tactcaaggt gagaattaag ttttaataaa acctataata ttttatctg

```

Figura 3

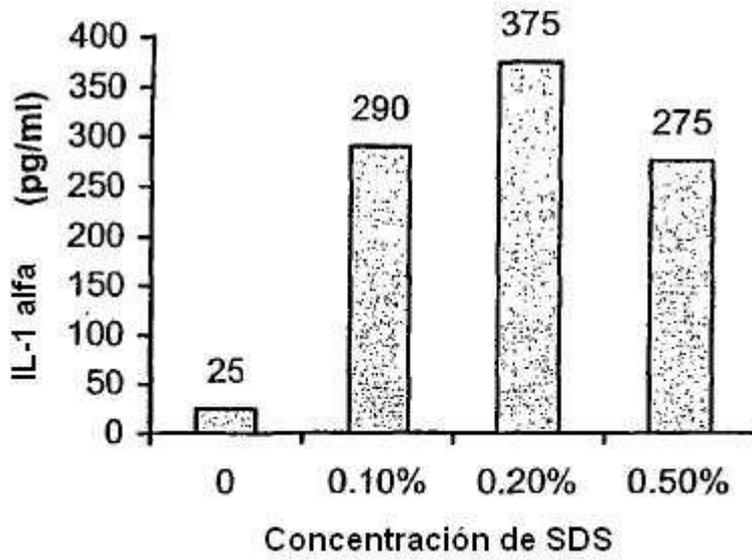


Figura 4

