

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 508**

51 Int. Cl.:

**A61F 2/10** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2006** **PCT/US2006/009107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.09.2006** **WO06101834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2006** **E 06738193 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017** **EP 1865884**

54 Título: **Sustitutos de piel con pureza mejorada**

30 Prioridad:

**17.03.2005 US 662831 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.07.2017**

73 Titular/es:

**STRATATECH CORPORATION (100.0%)**  
**SUITE 169, 505 SOUTH ROSA ROAD**  
**MADISON, WI 53719-1262, US**

72 Inventor/es:

**ALLEN-HOFFMANN, LYNN;**  
**IVARIE, CATHY, ANN-RASMUSSEN y**  
**CENTANNI, JOHN, M.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 622 508 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 con pureza mejorada

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 60/662.831 presentada el 17 marzo de 2005.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a sustitutos de piel cultivados *in vitro*. En particular, la presente invención se refiere a composiciones y a procedimientos para el desarrollo de sustitutos de piel cultivados.

**Antecedentes**

10 La piel es el órgano más grande del cuerpo humano. La piel consiste en las capas epidérmica y dérmica. La epidermis es la capa más externa, que forma parte de y es alimentada por la dermis más gruesa. Estas dos capas tienen aproximadamente 1-2 mm (0,04-0,08 pulgadas) de grosor. La epidermis consiste en una capa externa de células muertas, que proporciona un recubrimiento resistente y protector, y varias capas de células que se dividen rápidamente llamadas queratinocitos. La dermis contiene los vasos sanguíneos, los nervios, las glándulas sudoríparas, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas. La dermis consiste principalmente en tejido conectivo, principalmente el colágeno de proteína, que ofrece a la piel su flexibilidad y proporciona soporte estructural. Los fibroblastos, que producen colágeno, son el principal tipo de célula en la dermis.

15 La piel protege al cuerpo de la pérdida de líquidos, ayuda en la regulación de la temperatura y ayuda a evitar que las bacterias o virus que causan enfermedades entren en el cuerpo. La piel que se daña extensivamente por las quemaduras o las heridas no cicatrizantes puede comprometer la salud y el bienestar del paciente. Más de 50.000 personas se hospitalizan por tratamiento de quemaduras cada año en los Estados Unidos, y 5.500 mueren. Aproximadamente 4 millones de personas tienen heridas no cicatrizantes, incluyendo 1,5 millones con úlceras venosas y 800.000 con úlceras diabéticas, lo que resulta en 55.000 amputaciones por año en los Estados Unidos.

20 El tratamiento de la piel gravemente herida se complica ya que la dermis no es capaz de auto-restaurarse. Un procedimiento para tratar la piel herida es el injerto de piel. Más habitualmente, el injerto de piel se utiliza en la reconstrucción de la piel tras la extirpación quirúrgica de tumores malignos cutáneos. No obstante, los injertos de piel también se utilizan para cubrir úlceras cutáneas crónicas no cicatrizantes, para reemplazar tejido perdido en quemaduras de grosor completo, o para restaurar el cabello en áreas de alopecia.

25 La piel para injerto se puede obtener de otra área del cuerpo del paciente, llamada autoinjerto, si existe suficiente piel no dañada disponible, y si el paciente está lo suficientemente sano como para someterse a la cirugía adicional necesaria. Alternativamente, los autoinjertos de piel se pueden hacer con los propios queratinocitos de una persona a través de un proceso de cultivo. El uso de queratinocitos cultivados requiere un espécimen inicial de una pequeña biopsia de piel, aproximadamente tres semanas para que crezcan los queratinocitos en cultivo, y puede requerir el uso de productos adicionales para estabilizar la capa epidérmica cultivada una vez aplicada quirúrgicamente. Tales productos pueden obtenerse de otra persona (la piel del donante de cadáveres está congelada, almacenada y disponible para su uso), llamada aloinjerto, o de un animal (generalmente un cerdo), llamada xenoinjerto. Los aloinjertos y xenoinjertos se pueden aplicar asimismo directamente si el material de autoinjerto no está disponible, no obstante, estos productos proporcionan únicamente cobertura temporal— son rechazados por el sistema inmunológico del paciente en un plazo de 7-10 días y deben ser reemplazados con un autoinjerto.

30 Los tratamientos de la piel gravemente herida con autoinjertos cultivados tienen deficiencias. En comparación con la piel natural, la piel cultivada es muy frágil ya que no tiene capa dérmica, y es más susceptible a la infección ya que tiene únicamente unas pocas capas de células mal diferenciadas. El uso de autoinjertos de piel cultivada es costoso y requiere largos tiempos de cultivo. Adicionalmente, las células de capa alimentadora residuales (por ejemplo, capas alimentadoras derivadas murinas) utilizadas para soportar el crecimiento *in vitro* de queratinocitos pueden constituir una impureza dentro de las células en crecimiento, estirpes celulares o productos derivados de células. Como resultado, existe una fuerte necesidad de composiciones y procedimientos mejorados para detectar células de capa alimentadora residuales, especialmente células de capa alimentadora proliferantes, en queratinocitos cultivados y productos basados en queratinocitos para asegurar la pureza.

35 La recolección de células de una alimentadora se conoce en la técnica anterior, véanse por ejemplo DANIELS J T Y COL., "Human keratinocyte isolation and cell culture: A survey of current practices in the UK" BURNS, vol. 22, n.º 1, 1996, páginas 35-39, documento WO 02/086510 A1, CHOO A.B.H., "Expansion of Pluripotent Human Embryonic Stem Cells On Human Feeders" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 88, n.º 3, 2004, PONCHIO L. Y COL., "Mitomycin C as an Alternative to Irradiation to Inhibit the Feeder Layer Growth in Long-term Culture Assays" CYTOTHERAPY, vol. 2, n.º 4, 2000, página 281 y documento WO 02/070729 A2, el cultivo celular sin una capa de célula alimentadora también se conoce en la técnica anterior, véase por ejemplo Peehl D M, Ham R G, "Growth and differentiation of human keratinocytes without a feeder layer or conditioned medium." *In vitro* Junio 1980 vol. 16 NR PG. páginas 516-525, o documento WO 2005/012508 A1.

El documento WO2004/013606 A2 desvela procedimientos para identificar material específico de la especie en poblaciones de células, que difieren del procedimiento reivindicado de la presente invención, entre otras cosas, en la característica de que las células de capa alimentadora se analizan para la replicación tras el tratamiento con un agente y se descartan las células de la replicación. Las composiciones equivalentes de piel y las células de producto obtenidas por el procedimiento reivindicado pueden utilizarse en aplicaciones sensibles a la contaminación de la capa alimentadora.

### **Sumario de la invención**

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no caen dentro del ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

La presente invención se refiere a sustitutos de piel cultivados *in vitro*. En particular, la presente invención se refiere a composiciones y a procedimientos para el desarrollo de sustitutos de piel cultivados.

Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos para proporcionar células recolectadas de una capa alimentadora como se define en la reivindicación 1.

En algunas realizaciones, las células de producto son capaces de estratificarse en el epitelio escamoso. Las células de producto se seleccionan entre un grupo que consiste en queratinocitos primarios y/o inmortalizados. En algunas realizaciones preferentes, los queratinocitos son células NIKS. La presente invención no se limita al uso de cualquier capa alimentadora particular. De hecho, se contempla el uso con una variedad de capas alimentadoras. En algunas realizaciones, la capa alimentadora proporciona factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular necesarias para el crecimiento de las células de queratinocitos. En algunas realizaciones, la capa alimentadora está formada por células de fibroblastos murinos. En algunas realizaciones preferentes, las células de fibroblastos murinos son células 3T3. La presente invención no se limita al uso de cualquier agente particular que evite la replicación celular. De hecho, se contempla el uso de una variedad de tales agentes. En algunas realizaciones preferentes, el agente es mitomicina-C. En algunas realizaciones preferentes, la separación de las células de producto y las células de capa alimentadora se logra con EDTA. En algunas realizaciones, el análisis de las células de capa alimentadora para la replicación se logra con un análisis de la proliferación. En algunas realizaciones preferentes, las células de capa alimentadora están sustancialmente exentas de células de ratón replicantes. En otras realizaciones preferentes, son descartadas las células de capa alimentadora que demuestran replicación celular. En aún otras realizaciones preferentes, el análisis de las células de producto para la presencia de ADN de célula de capa alimentadora se logra con un análisis de PCR de ADN de ratón. En algunas realizaciones, se descartan las células de producto recolectadas de una capa alimentadora que contienen más de  $1,0 \times 10^4$  equivalentes de ADN de célula de capa alimentadora. En otras realizaciones, las células de producto recolectadas de una capa alimentadora contienen aproximadamente menos del 0,015 % de equivalentes de ADN de célula alimentadora en la población celular total. En algunas realizaciones, las células de producto son células madre. En algunas realizaciones, las células de producto se seleccionan entre un grupo que consiste en células de mamíferos. En realizaciones adicionales, se descartan las células de capa alimentadora que demuestran la replicación celular. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además la incorporación de células de producto en un equivalente de piel. En algunas realizaciones preferentes, el equivalente de piel está sustancialmente exento de células de capa alimentadora residuales.

En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden además la etapa de incorporar las células de producto en un producto. En algunas realizaciones preferentes, el producto está sustancialmente exento de células de capa alimentadora residuales. Las células pueden producirse de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente.

La presente descripción proporciona una composición equivalente de piel que comprende células de queratinocitos estratificados derivadas de cultivo *in vitro* con una capa alimentadora, en la que el equivalente de piel está sustancialmente exento de células de capa alimentadora residuales. No hay limitación a cualquier fuente particular de queratinocitos. De hecho, se contempla el uso de una variedad de fuentes de queratinocitos. Las células de queratinocitos pueden ser células NIKS. La presente descripción no se limita al uso de cualquier capa alimentadora particular. De hecho, se contempla el uso con una variedad de capas alimentadoras. La capa alimentadora puede proporcionar factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular necesarios para el crecimiento de células de queratinocitos. La capa alimentadora puede estar formada por células de fibroblastos murinos. Las células de fibroblastos murinos pueden ser células 3T3. La presente descripción no se limita al uso de cualquier agente particular que evite la replicación celular. De hecho, se contempla el uso de una variedad de tales agentes. El agente puede ser mitomicina-C. El equivalente de piel puede separarse de la capa alimentadora con EDTA. La capa alimentadora puede estar sustancialmente exenta de células alimentadoras replicantes. Los equivalentes de piel pueden contener menos del 0,015 % de equivalentes de ADN de célula alimentadora en la población celular total.

### **Descripción de las figuras**

La figura 1 representa la preparación celular, la dilución y el esquema de cultivo en placas para la investigación de la densidad celular. Las etapas 1 y 2 implican la dilución de células, y las etapas 3-7 implican la combinación y

el cultivo en placas de células. En la etapa 1, los fibroblastos 3T3 proliferantes, competentes para replicación se recolectaron, se contaron y se diluyeron en 50 ml de un medio de cultivo de 3T3 a una densidad celular de 250 células/ml [A]. En la etapa 2, las células 3T3 criopreservadas tratadas con mitomicina-C se descongelaron, se contaron y se diluyeron en un medio de cultivo de 3T3 a densidades celulares de 5.000 células/ml [B], 12.500 células/ml [C], 25.000 células/ml [D], y 50.000 células/ml [E]. En la etapa 3, se añadieron 573 µl de una suspensión de células 3T3 competentes para replicación [A] a 110 ml de un medio de cultivo de 3T3. Se transfirieron 200 µl de una suspensión de células 3T3 competentes para replicación a cada pocillo dando como resultado 25 células 3T3 competentes para replicación por placa [F]. En la etapa 4, se añadieron 573 µl de una suspensión de células 3T3 competentes para replicación [A] a 110 ml de una suspensión de células 3T3 tratadas con mitomicina-C [B]. Se transfirieron 200 µl de una suspensión de células combinadas a cada pocillo dando como resultado 1.000 células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo y 25 células 3T3 competentes para replicación por placa [G]. En la etapa 5, se añadieron 573 µl de una suspensión de células 3T3 competentes para replicación [A] a 110 ml de una suspensión de células 3T3 tratadas con mitomicina-C [C]. Se transfirieron 200 µl de una suspensión de células combinadas a cada pocillo dando como resultado 2.500 células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo y 25 células 3T3 competentes para replicación por placa [H]. En la etapa 6, se añadieron 573 µl de una suspensión de células 3T3 competentes para replicación [A] a 110 ml de una suspensión de células 3T3 tratadas con mitomicina-C [D]. Se transfirieron 200 µl de una suspensión de células combinadas a cada pocillo dando como resultado 5.000 células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo y 25 células 3T3 competentes para replicación por placa [I]. En la etapa 7, se añadieron 573 µl de una suspensión de células 3T3 competentes para replicación [A] a 110 ml de una suspensión de células 3T3 tratadas con mitomicina-C [E]. Se transfirieron 200 µl de una suspensión de células combinadas a cada pocillo dando como resultado 10.000 células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo y 25 células 3T3 competentes para replicación por placa [J]. La Figura 2 representa la comparación de las condiciones ensayadas para determinar la densidad celular óptima en la detección de fibroblastos 3T3 proliferantes.

La Figura 3 representa la preparación celular, la dilución y el esquema de cultivo en placas para determinar la sensibilidad de detección de la proliferación de 3T3. Las etapas 1 y 2 implican la dilución de células, las etapas 3-5 implican la combinación de células y las etapas 6-8 implican el cultivo en placas de células. En la etapa 1, los fibroblastos 3T3 proliferantes, competentes para replicación se recolectaron, se contaron y se diluyeron en 50 ml de un medio de cultivo de 3T3 a una densidad celular de 250 células/ml [A]. En la etapa 2, las células 3T3 criopreservadas tratadas con mitomicina-C se descongelaron, se contaron y se diluyeron en 50 ml de un medio de cultivo de 3T3 a una densidad celular de 25.000 células/ml [B]. En la etapa 3, se añadieron 573 µl de una suspensión de células 3T3 competentes para replicación [A] a 110 ml de un medio de cultivo de 3T3. En la etapa 4, se añadieron 573 µl de una suspensión de células 3T3 competentes para replicación [A] a 110 ml de una suspensión de células 3T3 tratadas con mitomicina-C [B]. En la etapa 5, se reservaron 110 ml de una suspensión de células 3T3 tratadas con mitomicina-C [B] para muestras experimentales. En la etapa 6, se transfirieron 200 µl de una suspensión de células 3T3 competentes para replicación [C] a cada pocillo dando como resultado 25 células 3T3 competentes para replicación por placa [F]. En la etapa 7, 200 µl de una suspensión de células 3T3 tratadas con mitomicina-C adicionadas con fibroblastos 3T3 competentes para replicación [D] se transfirieron a cada pocillo dando como resultado 5.000 células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo y 25 células 3T3 competentes para replicación por placa [G]. En la etapa 8, se transfirieron 200 µl de una suspensión de células 3T3 tratadas con mitomicina-C [E] a cada pocillo dando como resultado 5.000 células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo [H].

### **Definiciones**

Como se utiliza en la presente memoria, los términos "equivalente de piel" y "sustituto de 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.

Como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "célula de producto", "producto celular" o "producto derivado de una célula" se refieren a células o estirpes celulares capaces de un crecimiento *in vitro* sobre una capa alimentadora y productos generados a partir de células capaces de un crecimiento *in vitro* sobre una capa alimentadora. Los ejemplos incluyen, entre otros, queratinocitos, células madre y células sintéticas.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "capa alimentadora" se refiere a un sustrato derivado de células inactivadas para replicación utilizado para soportar el crecimiento *in vitro* de células o estirpes celulares. Ejemplos de capas alimentadoras incluyen, entre otros, capas alimentadoras de 3T3, capas alimentadoras murinas, capas alimentadoras sintéticas y sustratos sintéticos.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "células de capa alimentadora" se refiere a las células utilizadas para producir las capas alimentadoras que soportan el crecimiento *in vitro* de células o estirpes celulares. Los ejemplos de células de capa alimentadora incluyen, entre otros, fibroblastos 3T3, fibroblastos murinos y fibroblastos sintéticos.

Como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "medio" o "medio de crecimiento" se refieren a un medio líquido utilizado para soportar el crecimiento *in vitro* de células o estirpes celulares. Los ejemplos de medio de crecimiento incluyen, entre otros, medio DME, medio suplementado y medios de crecimiento sintéticos.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "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.

5 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "células madre" se refiere a células capaces de experimentar más de un destino de desarrollo.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "factor de crecimiento" se refiere a moléculas extracelulares que se unen a una superficie celular activando una vía de señalización intracelular que conduce a la proliferación, diferenciación u otra respuesta celular. Los ejemplos de factores de crecimiento incluyen, entre otros, factor de crecimiento I, factor trófico,  $\text{Ca}^{2+}$ , insulina, hormonas, moléculas sintéticas, agentes farmacéuticos y LDL.

10 Como se utiliza en la presente memoria, el término "interfase de aire" se refiere a la interfase entre la atmósfera y el medio líquido en una placa de cultivo.

15 Como se utiliza en la presente memoria, 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.

Como se utiliza en la presente memoria, 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*.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "células NIKS" se refiere a células que tienen las características de las células depositadas como la estirpe celular CACT CRL-12191.

20 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 cualquier 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  
25 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. Las secuencias que se localizan en 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias que se localizan en 3' o corriente abajo de la región codificante y que están presentes en  
30 el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" comprende tanto ADNc como 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 transcriben en ARN nuclear (ARNnh); los intrones pueden contener elementos reguladores, tales como potenciadores. Los intrones se extraen o "se separan por corte y empalme" del  
35 transcrito nuclear o primario; los intrones, por lo 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 que se va a producir.

40 Como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "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 hebra de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de los aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica (proteínica). Por consiguiente, la secuencia de ADN codifica la secuencia de aminoácidos.

45 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "molécula de ADN recombinante", como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula de ADN que está comprendida de segmentos de ADN unidos entre sí por medio de técnicas de biología molecular.

El término "aislado" cuando se utiliza 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 al menos un ácido nucleico contaminante con el que está asociado normalmente en su fuente natural. El ácido nucleico aislado está presente en una forma o configuración que es diferente de aquella en la que se encuentra en la naturaleza. En  
50 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 dada (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. El ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando se va a utilizar un ácido  
55 nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la hebra de sentido o codificación (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), aunque puede contener tanto las hebras de sentido como antisentido (es decir, el oligonucleótido o

polinucleótido puede ser bicatenario).

Como se utiliza en la presente memoria, el término "parte" cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos (como en "una parte de una secuencia de nucleótidos dada") se refiere a fragmentos de esa secuencia. Los fragmentos pueden variar en tamaño desde cuatro nucleótidos hasta la secuencia de nucleótidos completa menos un nucleótido (10 nucleótidos, 20, 30, 40, 50, 100, 200, etc.).

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "región codificante" cuando se utiliza en referencia a un gen estructural se refiere a las secuencias de nucleótidos que codifican los aminoácidos encontrados en el polipéptido que va a producirse como resultado de la traducción de una molécula de ARNm. La región codificante está unida en eucariotas en el lado 5' por el triplete de nucleótidos "ATG" que codifica la metionina iniciadora y en el lado 3' por uno de los tres tripletes que especifican los codones de parada (es decir, TAA, TAG, TGA).

Como se utiliza en la presente memoria, 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".

El término "vector de expresión", como se utiliza en la presente memoria, 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 procariotas incluyen generalmente 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.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "célula huésped" se refiere a cualquier célula eucariota o procariota (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.

Los términos "sobrexpresión" y "que sobreexpresa" y equivalentes gramaticales, se utilizan en referencia a los niveles de ARNm para indicar un nivel de expresión aproximadamente 3 veces mayor que los observados normalmente en un tejido dado 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 materia, incluyendo, entre otros, análisis de membrana Northern. Se incluyen controles apropiados en la membrana 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 específica de ARNm observada en las membranas Northern). Se cuantifica la cantidad de ARNm presente en la banda correspondiente en tamaño al ARN del transgén correctamente cortado y empalmado; otras especies menores de ARN que se hibridan a la sonda transgén no se consideran en la cuantificación de la expresión del ARNm transgénico.

El término "transfección", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la introducción de ADN exógeno en células eucariotas. La transfección puede lograrse por una diversidad de medios 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.

La expresión "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 forma estable el ADN exógeno en el ADN genómico.

La expresión "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 rigen la expresión de genes endógenos en los cromosomas. La expresión "transfectante transitorio" se refiere a células que captan ADN exógeno aunque no consiguen integrarse en este ADN.

La expresión "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, *Virol.*, 52:456 [1973]), se ha modificado por varios grupos para optimizar las condiciones de tipos particulares de células. La técnica es muy consciente de estas numerosas modificaciones.

La expresión "compuesto de ensayo" se refiere a cualquier entidad química, producto farmacéutico, fármaco y similares que se puede utilizar para tratar o prevenir una enfermedad, dolencia, mal o trastorno de la función corporal, o que en cualquier caso altera el estado fisiológico o celular de una muestra. Los compuestos de ensayo comprenden tanto compuestos terapéuticos conocidos como potenciales. Se puede determinar que un compuesto

de ensayo es terapéutico mediante la identificación sistemática utilizando los procedimientos de identificación sistemática de la presente invención. 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.

- 5 El término "muestra", como se utiliza en la presente memoria, se utiliza en su 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 una célula (por ejemplo, la propagación de cromosomas de metafase), ADN genómico (en solución o unido a un soporte sólido, tal como para análisis de membrana Southern), ARN (en solución o unido a un soporte sólido, tal como para análisis de membrana 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.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "respuesta", cuando se utiliza en referencia a un análisis, se refiere a la generación de una señal detectable (por ejemplo, acumulación de proteína indicadora, aumento de la concentración de iones, acumulación de un producto químico detectable).

- 15 Como se utiliza en la presente memoria, el término "gen indicador" se refiere a un gen que codifica una proteína que se puede analizar. Los ejemplos de genes indicadores incluyen, entre otros, luciferasa (véanse, por ejemplo, de Wet y col., *Mol. Cell. Biol.* 7:725 [1987] y las patentes de Estados Unidos n.º 6.074.859; 5.976.796; 5.674.713; y 5.618.682), proteína verde fluorescente (por ejemplo, número de acceso a GenBank U43284, un conjunto de variantes de PVF están disponibles comercialmente en CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA), cloranfenicol acetiltransferasa,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante.

### **Descripción detallada**

La presente invención se refiere a sustitutos de piel cultivados *in vitro*. En particular, la presente invención se refiere a composiciones y a procedimientos para el desarrollo de sustitutos de piel cultivados.

- 25 La piel humana se compone de una capa dérmica que contiene fibroblastos incrustados en una matriz proteica 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 fluidos corporales debido a la evaporación y proteger el cuerpo de las agresiones ambientales, tales como productos químicos y microorganismos. Esta función de barrera está localizada en el estrato córneo de la piel. 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.

- El epitelio escamoso estratificado, tal como la piel y el epitelio oral, son tejidos de regeneración de múltiples capas compuestos principalmente de queratinocitos. Los queratinocitos diferenciados se pierden continuamente de la superficie y se reemplazan mediante la proliferación de queratinocitos basales. La velocidad a la que una célula basal inicia y completa su programa de diferenciación parece estar estrechamente regulada, aunque los controles moleculares para dicha regulación están poco definidos (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 la formación de haces de filamentos intermedios de queratina mediada por filagrina, y la liberación de lípidos de los gránulos que recubren la membrana en el espacio intercelular (Schurer y col., *Dermatologica*, 183: 77-94 (1991)). La envoltura córnea, otra estructura de diferenciación terminal que consiste en varias proteínas que están reticuladas de forma covalente por la acción de transglutaminasas dependientes de calcio, también se forma en la diferenciación de queratinocitos (Aeschlimann y col., *Thrombosis & Haemostasis*, 71(4): 402-15 (1994); Reichert y col., *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 fractura. Los mecanismos moleculares que gobiernan la enucleación de queratinocitos y la diferenciación terminal son poco conocidos. Los estudios ((Sachsenmeier y col., *J. Biol. Chem.*, 271: 5-8 (1996); Hines y col., *Notes Promega*, 59: págs. 30-36 (1996); Hines y col., *J. Biol. Chem.*, 271(11): 6245-6251 (1996); Polakowska y col., *Developmental Dynamics*, 199(3): 176-88 (1994); Haake y col., *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.

- La presente invención proporciona procedimientos para fabricar sustitutos de piel. Además, la presente invención proporciona procedimientos para fabricar sustitutos de piel sin ADN murino residual o células murinas capaces de replicación. Para mayor comodidad, la descripción de la invención se presenta en las siguientes secciones: A) fuentes de queratinocitos y otras células para crear sustitutos de piel; B) condiciones de cultivo para crear sustitutos de piel; y C) usos de los sustitutos de piel, y D) uso de procedimientos para la producción de otros productos celulares que están sustancialmente exentos de células de capa alimentadora.

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

Se contempla que los procedimientos de la presente invención pueden utilizarse para crear sustitutos de piel. Las

células o estirpe celular utilizadas en el procedimiento de la reivindicación 1 que pueden estratificarse en el epitelio escamoso son útiles en la presente invención. El procedimiento de la reivindicación 1 contempla el uso de queratinocitos tanto primarios como inmortalizados. Las fuentes de células incluyen queratinocitos y fibroblastos dérmicos biopsiados procedentes de donantes humanos y cavadéricos (Auger y col., *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal* 36:96-103; patentes de Estados Unidos n.º 5.968.546 y 5.693.332), prepucios neonatales (Asbill y col., *Pharm. Research* 17(9): 1092-1097 (2000); Meana y col., *Burns* 24:621-30 (1998); patentes de Estados Unidos n.º 4.485.096, 6.039.760; y 5.536.656), y estirpes celulares de queratinocitos inmortalizados, tales como células NM1 (Baden, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23(3):205-213 (1987)), células HaCaT (Boucamp y col., *J. cell. Boil.* 106:761-771 (1988)); y células NIKS (estirpe celular BC-1-Ep/SL; patente de Estados Unidos n.º 5.989.837; CACT CRL-12191). Cada una de estas estirpes celulares puede cultivarse como se describe a continuación con el fin de producir un equivalente de piel.

En realizaciones particularmente preferentes, se utilizan células NIKS. El descubrimiento de una nueva estirpe celular de queratinocitos humanos (queratinocitos inmortalizados o NIKS casi diploides) ofrece una oportunidad para desarrollar por ingeniería genética queratinocitos humanos para nuevos procedimientos de ensayo *in vitro*. Una ventaja única de las células NIKS es que son una fuente constante de queratinocitos humanos genéticamente uniformes, exentos de patógenos. Por este motivo, son útiles para la aplicación de enfoques de ingeniería 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 a la utilización de animales para ensayar los compuestos y formulaciones. La estirpe celular de queratinocitos NIKS, identificada y caracterizada en la Universidad de Wisconsin, es no tumorigénica, exhibe un cariotipo estable, y exhibe una diferenciación normal tanto en cultivo monocapa como organotípico. Las células NIKS forman equivalentes de piel totalmente estratificados en cultivo. Estos cultivos son indistinguibles por todos los criterios ensayados hasta el momento de cultivos organotípicos formados por queratinocitos humanos primarios. A diferencia de las células primarias, las células inmortalizadas NIKS continuarán, sin embargo, proliferándose de forma indefinida en un cultivo monocapa. Esto ofrece una oportunidad para manipular genéticamente las células y aislar nuevos clones de células con nuevas propiedades útiles (Allen-Hoffmann y col., *J. Invest. Dermatol.*, 114(3):444-455 (2000)).

Las células NIKS surgieron de la cepa BC-1-Ep de los queratinocitos del prepucio neonatal humano aislados de un infante varón aparentemente normal. En los primeros pases, las células BC-1-Ep no exhibieron características morfológicas o de crecimiento que fueran atípicas para queratinocitos humanos normales cultivados. Las células BC-1-Ep cultivadas exhibieron estratificación, así como distintivos de muerte celular programada. Para determinar la vida de replicación, las células BC-1-Ep se cultivaron en serie hasta la senescencia en un medio de crecimiento de queratinocitos convencional a una densidad de  $3 \times 10^5$  células por placa de 100 mm y se realizaron pases a intervalos semanales (aproximadamente una separación de 1:25). En el pase 15, la mayoría de los queratinocitos en la población parecían senescentes a juzgar por la presencia de numerosas colonias abortivas que exhibían células grandes y planas. No obstante, en el pase 16, los queratinocitos que exhibían un tamaño de células pequeñas eran evidentes. En el pase 17, solo 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 a este periodo de crisis putativa parecían morfológicamente uniformes y produjeron colonias de queratinocitos que exhibían 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 densidad de  $3 \times 10^5$  células por placa de 100 mm. Normalmente, los cultivos alcanzaron una densidad celular de aproximadamente  $8 \times 10^6$  células en un plazo de 7 días. Esta tasa estable de crecimiento celular se mantuvo a través de al menos 59 pases, lo que demuestra que las células habían alcanzado la inmortalidad. Los queratinocitos que emergieron de la población senescente original fueron designados originalmente como la línea espontánea/BC-1-Ep y ahora se denominan NIKS. La estirpe celular NIKS ha identificado sistemáticamente la presencia de secuencias de ADN proviral para VIH-1, VIH-2, VEB, CMV, VLCTH-1, VLCTH-2, VHB, VHC, parvovirus B-19, VHP-16 y VPH-31 al utilizar PCR o análisis de Southern. No se detectó ninguno de estos virus.

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 contenían 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.

Las huellas genéticas de ADN para la estirpe celular NIKS y los queratinocitos BC-1-Ep son idénticas en todos los doce loci analizados, lo que demuestra que las células NIKS surgieron de la población de BC-1-Ep parental. Las probabilidades de que la estirpe celular NIKS tenga la huella genética de ADN de BC-1-Ep parental por azar son de  $4 \times 10^{-16}$ . Las huellas genéticas de ADN a partir de tres fuentes diferentes de queratinocitos humanos, ED-1-Ep, SCC4 y SCC13y son diferentes del patrón 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 ofrecen una manera inequívoca para identificar la estirpe celular NIKS.

La pérdida de la función de p53 está asociada con un potencial proliferativo potenciado 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 a GenBank: M14695). En los seres humanos, existe p53 en dos

formas polimórficas predominantes que se distinguen por el aminoácido en el codón 72. Los dos 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-1-Ep. Rb también se encontró que era de tipo natural en las células NIKS.

5 El crecimiento independiente del anclaje está altamente correlacionado con la tumorigenicidad *in vivo*. Por este motivo, 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.

10 Para determinar la tumorigenicidad de los queratinocitos de BC-1-EP parentales y la estirpe celular de queratinocitos inmortales NIKS, se inyectaron las células en los flancos de ratones desnudos atímicos. La estirpe 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 tal que los animales recibieron células SCC4 en un flanco y, los queratinocitos BC-1-Ep parentales o las células NIKS en el flanco opuesto. Esta estrategia de  
15 inyección eliminó la variación entre animales en la producción tumoral y confirmó que los ratones soportarían el crecimiento vigoroso de células tumorigénicas. Ni los queratinocitos BC-1-EP parentales (pase 6) ni los queratinocitos NIKS (pase 35) produjeron tumores en ratones desnudos atímicos.

Se analizaron células NIKS para la capacidad de experimentar diferenciación tanto en cultivo de superficie como en el cultivo organotípico. Para las células en el cultivo de superficie, se controló un marcador de diferenciación  
20 escamosa, la formación de envolturas córneas. En queratinocitos humanos cultivados, las primeras etapas de ensamblaje de envolturas córneas dan como resultado la formación de una estructura inmadura compuesta de involucrina, cistatina- $\alpha$  y otras proteínas, que representan la tercera de las envolturas córneas maduras más interna. Menos del 2 % de los queratinocitos de las células BC-1-Ep adherentes o la estirpe celular NIKS producen envolturas córneas. Este hallazgo es consistente con estudios previos que demuestran que los queratinocitos  
25 subconfluente de crecimiento activo producen menos de 5 % de envolturas córneas. Para determinar si la estirpe celular NIKS es capaz de producir envolturas córneas cuando se induce para diferenciarse, las células se extrajeron del cultivo de superficie y se suspendieron durante 24 horas en un medio fabricado semisólido con metilcelulosa. Muchos aspectos de la diferenciación terminal, incluyendo la expresión diferencial de las queratinas y la formación de envolturas córneas, se pueden activar *in vitro* por la pérdida de queratinocitos célula-célula y la adhesión célula-sustrato. Los queratinocitos NIKS produjeron tantas envolturas córneas, y por lo general, más que los queratinocitos parentales. Estos hallazgos demuestran que los queratinocitos NIKS no son defectuosos en su capacidad para  
30 iniciar la formación de esta estructura de diferenciación específica del tipo celular.

Para confirmar que los queratinocitos NIKS pueden experimentar una diferenciación escamosa, las células se cultivaron en un cultivo organotípico. Los cultivos de queratinocitos cultivados en sustratos de plástico y sumergidos  
35 en un medio se replican, pero exhiben 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. Por microscopía óptica y electrónica existen diferencias notables entre la arquitectura de las láminas de múltiples capas formadas en el cultivo tisular y la piel humana intacta. Por el contrario, 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 incrustados  
40 en una base de colágeno fibrilar. El cultivo organotípico se mantiene en la interfase de aire-medio. De esta manera, las células en las láminas superiores se exponen al aire, mientras que las células basales proliferantes permanecen más cercanas al gradiente de nutrientes proporcionados por difusión a través del gel de colágeno. En estas condiciones, se forma una arquitectura tisular correcta. Varias características de una epidermis normal de diferenciación resultan evidentes. En las células parentales y la estirpe celular NIKS, una única capa de células basales cuboidales descansa en la unión de la epidermis y el equivalente dérmico. La morfología redondeada y la relación alta de núcleo 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 de  
45 forma ascendente a las capas de diferenciación del tejido. Las células hijas aumentan de tamaño, y se vuelven aplanadas y escamosas. Con el tiempo, estas células se enuclean y forman estructuras queratinizadas córneas. Este proceso de diferenciación normal es evidente en las capas superiores de tanto las células parentales como las células NIKS. La aparición de células escamosas aplanadas es evidente en las capas superiores de los queratinocitos y demuestra que la estratificación se ha producido en los cultivos organotípicos. En la parte más superior de los cultivos organotípicos, las escamas enucleadas se desprenden de la parte superior del cultivo. Hasta  
50 la fecha, no se han observado diferencias histológicas en la diferenciación a nivel de microscopio óptico entre los queratinocitos parentales y la estirpe celular de queratinocitos NIKS cultivada en el cultivo organotípico.

Para observar las características más detalladas de los cultivos organotípicos parentales (pase 5) y NIKS (pase 38) y para confirmar las observaciones histológicas, se analizaron las muestras mediante microscopía electrónica. Las células parentales y la estirpe celular de queratinocitos humanos inmortalizados, NIKS, se recolectaron después de  
60 15 días en cultivo organotípico y se seccionaron perpendicularmente a la capa basal para mostrar el grado de estratificación. Las células parentales y la estirpe celular NIKS experimentan una extensa 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 estirpe celular NIKS. Asimismo se observó la formación de una lámina basal y los hemidesmosomas asociados en las capas de queratinocitos basales de las células parentales y la estirpe celular. Los hemidesmosomas son estructuras especializadas que aumentan 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 fue especialmente evidente en áreas en las que las células parentales o las células NIKS se han unido directamente al soporte poroso. Estos hallazgos son consistentes con los hallazgos ultraestructurales previos que utilizan queratinocitos de prepucio humano cultivados sobre un soporte poroso que contiene fibroblastos. El análisis a nivel de microscopía óptica y de electrones demuestra que la estirpe celular NIKS en un cultivo organotípico puede estratificarse, diferenciarse, y formar estructuras, tales como desmosomas, lámina basal, y hemidesmosomas que se encuentran en la epidermis humana normal.

#### **B. Condiciones de cultivo para crear equivalentes de piel que están sustancialmente exentos de células de capa alimentadora**

La presente invención proporciona procedimientos que permiten producir equivalentes de piel que están sustancialmente exentos de células de capa alimentadora residuales. "Sustancialmente exento" significa que los equivalentes de piel comprenden preferentemente menos de 0,001 % células de capa alimentadora en una base celular de producto/células de capa alimentadora. Más preferentemente, los equivalentes de piel comprenderán menos de 0,0001 % células de capa alimentadora en una base celular de producto/células de capa alimentadora. Se utilizan células de capa alimentadora para soportar el crecimiento *in vitro* de una variedad de células o estirpes celulares que incluyen queratinocitos y células madre. Para cultivar algunas células, en particular a densidad baja o clonal, es necesario el uso de una capa de células menos exigentes para acondicionar el medio. A menudo, las células de la capa alimentadora son irradiadas o tratadas de otro modo para que no proliferen. En algunos casos, la capa alimentadora puede producir factores de crecimiento o citoquinas. Las capas alimentadoras se suelen derivar a partir de fibroblastos murinos. Un inconveniente importante con las capas alimentadoras murinas es la impureza asociada con el ADN murino residual y/o la replicación celular murina en las células cultivadas o en las estirpes celulares. Como resultado, es absolutamente necesario procedimientos destinados a prevenir dichas impurezas en la capa alimentadora murina.

La presente invención proporciona procedimientos destinados a evitar impurezas en la capa alimentadora murina. En particular, la presente invención proporciona procedimientos para generar sustitutos de piel cultivados en capas alimentadoras murinas que no contienen células de capa alimentadora proliferantes. En algunas realizaciones, la presente invención utiliza capas alimentadoras murinas. En realizaciones adicionales, la presente invención utiliza capas alimentadoras 3T3 murinas. En aún realizaciones adicionales, la presente invención utiliza capas alimentadoras 3T3.

Los fibroblastos 3T3 murinos tratados con mitomicina-C para inhibir la proliferación, se han utilizado como capas alimentadoras en el cultivo de queratinocitos humanos *in vitro* (Watt, F. (1998) en: *Cell Biology: A Laboratory Handbook* vol. 1, 2ª Ed., Academic Press). Además, las capas alimentadoras que comprenden células 3T3 inactivadas de forma mitótica secretan factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular que potencian el crecimiento de las células epiteliales. En algunas realizaciones de la presente invención, las capas alimentadoras serán tratadas para prevenir la replicación celular. La presente invención no se limita a ningún determinado tipo de agente para prevenir la replicación celular. En realizaciones preferentes, la presente invención utiliza mitomicina-C.

Se contempla que en ciertas realizaciones, la producción de la presente invención implica un procedimiento de cultivo de múltiples etapas. Sin embargo, la presente invención no se limita a ningún procedimiento de cultivo de múltiples etapas particular. En realizaciones preferentes, el procedimiento de cultivo de múltiples etapas conlleva una etapa de inicio, una etapa de expansión, y una etapa de estratificación. En algunas realizaciones, estas etapas se denominan en general como una fase de cultivo sumergido.

Durante la etapa de inicio, las células NIKS se cultivaron en placas en fibroblastos 3T3 murinos inactivados por replicación. En algunas realizaciones, las células NIKS y los fibroblastos 3T3 murinos son criopreservados antes de la etapa de inicio del cultivo. En algunas realizaciones, se utilizan entre  $1 \times 10^6$  y  $15 \times 10^6$  células 3T3 inactivadas por replicación. En otras realizaciones, se utilizan entre  $5 \times 10^6$  y  $10 \times 10^6$  células 3T3 inactivadas por replicación. Finalmente, en realizaciones preferentes, se utilizan entre  $7 \times 10^6$  y  $8 \times 10^6$  células 3T3 inactivadas por replicación (aproximadamente 27.300 células/cm<sup>2</sup> en placas de 275 cm<sup>2</sup>). En algunas realizaciones preferentes, se realizaron pases de células en 50 ml de medio y después se trataron con 120 ml de medio que contiene mitomicina-C durante 4 horas.

En algunas realizaciones, la cantidad de tiempo permitido para la etapa de inicio del crecimiento celular de NIKS es más de una semana. En realizaciones preferentes, la cantidad de tiempo permitido para el crecimiento celular de NIKS es de una semana o menos. Además, después de la etapa de inicio del crecimiento celular de NIKS en la capa alimentadora, se retira la capa alimentadora. En algunas realizaciones, la capa alimentadora se retira tras menos de un monocapa de la etapa de inicio del crecimiento celular de NIKS. En realizaciones preferentes, la capa alimentadora se retira después de que esté presente un monocapa de la etapa de inicio del crecimiento celular de NIKS.

El tratamiento con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) elimina selectivamente las capas alimentadoras del co-cultivo de queratinocitos eliminando así las células 3T3 inactivadas por replicación tratadas con mitomicina-C no deseadas hasta la compleción de una fase de cultivo en monocapa dado de células NIKS. La presente invención no se limita a un determinado agente disipador de la capa alimentadora de la etapa de inicio. En realizaciones preferentes, EDTA se utiliza como agente disipador de la capa alimentadora de la etapa de inicio.

Durante la fase de expansión, las células NIKS cultivadas durante la etapa de inicio se cultivan en placas en fibroblastos 3T3 murinos inactivados por replicación. En realizaciones preferentes, las células NIKS utilizadas se generan en una etapa de inicio. En algunas realizaciones de la etapa de expansión, se utilizan entre  $15 \times 10^6$  y  $40 \times 10^6$  células 3T3 inactivadas por replicación. En otras realizaciones, se utilizan entre  $20 \times 10^6$  y  $25 \times 10^6$  células 3T3 inactivadas por replicación. Por último, en realizaciones preferentes, se utilizan entre  $24 \times 10^6$  y  $26 \times 10^6$  células 3T3 inactivadas por replicación (aproximadamente  $22.700 \text{ células/cm}^2$  en placa de  $1.125 \text{ cm}^2$ ).

En algunas realizaciones la cantidad de tiempo permitido para el crecimiento celular de NIKS es más de una semana. En realizaciones preferentes, la cantidad de tiempo permitido para el crecimiento celular de NIKS es de una semana o menos. Además, después del crecimiento de las células NIKS en la capa alimentadora, se retira la capa alimentadora. En algunas realizaciones, la capa alimentadora se retira tras menos de un monocapa de la etapa de expansión del crecimiento celular de NIKS. En realizaciones preferentes, la capa alimentadora se retira después de que esté presente un monocapa de etapa de expansión del crecimiento celular de NIKS. La presente invención no se limita a un determinado agente disipador de la capa alimentadora de la etapa de expansión. En realizaciones preferentes, EDTA se utiliza como agente disipador de la capa alimentadora de la etapa de expansión.

Durante la etapa de estratificación, las células NIKS se cultivan en placas en equivalentes dérmicos. En realizaciones preferentes, las células NIKS son generadas en una etapa de expansión. La presente invención no se limita a un determinado tipo de equivalente dérmico. En realizaciones preferentes, el equivalente dérmico es el tejido del sujeto (por ejemplo, caballo, humano, gato, perro, etc.). En otras realizaciones, el equivalente dérmico puede ser un tejido sintético. Además, en algunas realizaciones, la cantidad de tiempo permitido para la etapa de estratificación del crecimiento es menos de dos semanas. En realizaciones preferentes, la cantidad de tiempo permitido para la etapa de estratificación del crecimiento celular de NIKS es de al menos dos semanas.

La presente invención contempla que un pequeño número de células 3T3 inactivadas por replicación tratadas con mitomicina-C puede permanecer después del tratamiento con EDTA. Como tal, en algunas realizaciones, las células NIKS se ensayan para determinar la cantidad de ADN murino presente en el crecimiento de células NIKS. Las preparaciones de células NIKS que tienen más de una cantidad aceptable de ADN de ratón no se utilizan para la estratificación o para su procesamiento posterior, si ya se ha producido la estratificación. El ensayo de ADN de ratón se puede emplear al concluir la etapa inicial, la etapa de expansión y/o la etapa de estratificación. En realizaciones preferentes, el ensayo de ADN de ratón se emplea al concluir las etapas de inicio, expansión y estratificación (es decir, al concluir la etapa de inmersión). En algunas realizaciones, una cantidad aceptable de ADN murino presente en un producto de células NIKS acabado es inferior a  $5 \times 10^4$  equivalentes de ADN celular murino/dosis de células NIKS. Un equivalente de ADN celular murino es la cantidad de ADN específico de células de ratón por conjunto de cromosomas haploides. Una dosis de células NIKS es una muestra de  $44,2 \text{ cm}^2$  de producto de células NIKS acabado. En realizaciones preferentes, una cantidad aceptable de ADN murino presente en un producto de células NIKS acabado es inferior a  $1,45 \times 10^4$  equivalentes de ADN celular murino por dosis de células NIKS. Además, las células murinas pueden constituir no más del 0,015 % de la población celular total. La Tabla 1 resume varios cálculos de límites de células 3T3 aceptables.

**Tabla 1: Cálculo de límites aceptables de células 3T3.** Los valores que representan cálculos para el procedimiento del ensayo de liberación del lote "Evaluación de StrataGraft™ para ADN de ratón" limitan además los niveles históricos de ADN de ratón detectados y la detección teórica de no más de 1 equivalente de ADN celular.

|                                                                    | Límite del procedimiento de ensayo                         | Histórico                                                 | Teórico                                                |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>Evaluación de StrataGraft™ para ADN de ratón</b>                | No más de 13,2 equivalentes de ADN de célula/0,5 µg de ADN | No más de 3,3 equivalentes de ADN de célula/0,5 µg de ADN | No más de 1 equivalente de ADN de célula/0,5 µg de ADN |
| <b>Equivalentes de célula de ratón por población celular total</b> | 0,015 %                                                    | 0,004 %                                                   | 0,0011 %                                               |

(continuación)

|                                                                   | <b>Límite del procedimiento de ensayo</b>                            | <b>Histórico</b>                                                    | <b>Teórico</b>                                                      |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>Por punzón tisular de 8 mm (0,5 cm<sup>2</sup>)</b>            | No más de 163 equivalentes de ADN de célula/6,2 µg de ADN            | No más de 41 equivalentes de ADN de célula/6,2 µg de ADN            | No más de 12,4 equivalentes de ADN de célula/6,2 µg de ADN          |
| <b>Por tejido de StrataGraft™ (1 dosis) (44,2 cm<sup>2</sup>)</b> | No más de 1,45 x 10 <sup>4</sup> equivalentes de ADN de célula/dosis | No más de 3,6 x 10 <sup>3</sup> equivalentes de ADN de célula/dosis | No más de 1,1 x 10 <sup>3</sup> equivalentes de ADN de célula/dosis |
| <b>Por lote de 5 tejidos de StrataGraft™ (221 cm<sup>2</sup>)</b> | No más de 7,2 x 10 <sup>4</sup> equivalentes de ADN de célula/lote   | No más de 1,8 x 10 <sup>4</sup> equivalentes de ADN de célula/lote  | No más de 5,5 x 10 <sup>3</sup> equivalentes de ADN de célula/lote  |

Una identificación sistemática alternativa puede emplearse en la presente invención para detectar células de capa alimentadora que son capaces de replicación. De hecho, un objetivo de la invención actual es proporcionar garantías de que cada célula 3T3 admisible en un lote final sea inactivada por replicación y no sea capaz de proliferación. Para asegurarse de que la capacidad de los fibroblastos 3T3 en replicarse se ha eliminado completamente mediante el tratamiento con mitomicina-C, cada lote de células 3T3 tratadas con mitomicina-C puede ser evaluado por un ensayo de proliferación. El procedimiento de ensayo examina las células 3T3 tratadas con mitomicina-C de cualquier evidencia de proliferación de 3T3. En realizaciones preferentes, el estándar requerido para que las células 3T3 tratadas con mitomicina-C se consideren apropiadas para su uso en la producción de la presente invención es de una proliferación de 3T3 de cero. En algunas realizaciones, el procedimiento de detección de proliferación se utiliza para identificar sistemáticamente cualquier capa alimentadora. En otras realizaciones, el procedimiento de detección de proliferación se utiliza para identificar sistemáticamente capas alimentadoras de 3T3 antes del uso en la etapa de inicio y/o la etapa de expansión. En realizaciones preferentes, el procedimiento de detección de proliferación se utiliza para identificar sistemáticamente capas alimentadoras de 3T3 antes de su uso en la etapa de inicio y/o la etapa de expansión.

El ensayo de proliferación y los procedimientos de ensayo del análisis de ADN de ratón se incorporan en diferentes puntos del procedimiento de producción y se complementan entre sí. En combinación, estos dos procedimientos de ensayo evalúan y eliminan eficazmente la posible presencia de células 3T3 competentes para replicación en el producto sustituto de piel final. El ensayo de ADN de ratón limita la cantidad total de ADN de 3T3, expresado como equivalentes de ADN de célula, admisible en el tejido sustituto de piel final, mientras que el ensayo de proliferación asegura que cualquier célula 3T3 intacta presente no es capaz de replicarse y proliferarse posteriormente. Las impurezas asociadas con el uso de una capa alimentadora durante el cultivo celular y la producción de productos celulares cultivados son un problema importante en la técnica. Las células de producto, tales como los queratinocitos o células madre, cultivadas en capas alimentadoras identificadas sistemáticamente con el ensayo de ADN de ratón y el ensayo de proliferación están sustancialmente exentas de células de capa alimentadora residuales y de cualquier impureza resultante. En realizaciones preferentes, el ensayo de ADN de ratón y el ensayo de proliferación se utilizan en la producción de la presente invención.

### **C. Usos de los sustitutos de piel**

Se contempla que los sustitutos de piel obtenidos por el procedimiento de la presente invención tienen una variedad de usos. Estos usos incluyen, entre otros, el uso para identificar sistemáticamente compuestos (por ejemplo, irritantes), sustratos para cultivar tumores y agentes patológicos (por ejemplo, virus del papiloma humano), y el uso para el cierre de heridas y el tratamiento de quemaduras. Estos usos se describen con más detalle a continuación.

#### **1. Uso para identificar sistemáticamente compuestos**

Los equivalentes de piel obtenidos por el procedimiento de la presente invención pueden utilizarse para diversos ensayos *in vitro*. En particular, los equivalentes de piel encuentran uso en la evaluación de: productos para el cuidado de la piel, metabolismo de fármacos, respuestas celulares a compuestos de ensayo, cicatrización 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 ensayar, incluyendo, entre otros, placas de 6 pocillos, 24 pocillos y 96 pocillos. Adicionalmente, los equivalentes de piel pueden dividirse mediante técnicas de disección convencional y luego se ensayan. Los equivalentes de piel tienen tanto una capa epidérmica con un estrato córneo diferenciado como una capa dérmica que incluye fibroblastos dérmicos. Como se ha descrito previamente, en realizaciones particularmente preferentes, la capa epidérmica se deriva de células NIKS inmortalizadas. Otras estirpes celulares preferentes, incluyendo células NIKS, se caracterizan por i) ser inmortalizadas; ii) no ser tumorigénicas; iii) formar envolturas córneas cuando se inducen para diferenciarse; iv) experimentar una diferenciación escamosa normal en cultivos organotípicos; y v) mantener los requisitos de

crecimiento específicos del tipo celular en un cultivo sumergido, en el que dichos requisitos de crecimiento específicos del tipo celular incluyen: 1) exhibición de características morfológicas de queratinocitos humanos normales cuando se cultivan en un medio de crecimiento de queratinocitos convencional en presencia de células alimentadoras 3T3 tratadas con mitomicina-C; 2) dependencia de factor de crecimiento epidérmico para el cultivo en serie; y 3) inhibición del crecimiento por el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$ .

La presente descripción abarca una variedad de ensayos de identificación sistemática. Por ejemplo, el procedimiento de identificación sistemática comprende proporcionar un equivalente de piel y al menos un compuesto o producto de ensayo (por ejemplo, un producto para el cuidado de la piel, tal como una hidratante, cosmético, tinte, o fragancia; los productos pueden estar en cualquier forma, incluyendo, entre otros, cremas, lociones, líquidos y pulverizadores), aplicar el producto o el compuesto de ensayo al equivalente de piel, y analizar el efecto del producto o compuesto de prueba sobre el equivalente de piel. Una amplia variedad de ensayos se utiliza para determinar el efecto del producto o compuesto de ensayo sobre el equivalente de piel. Estos ensayos incluyen, entre otros, ensayos de citotoxicidad por MTT (Gay, *The Living Skin Equivalent as an In Vitro Model for Ranking the Toxic Potential of Dermal irritants, Toxic. In vitro* (1992)) y ELISA para ensayar la liberación de moduladores inflamatorios (por ejemplo, prostaglandina E2, prostaciclina, e interleucina-1-alfa) y quimioatrayentes. Los ensayos pueden ser dirigidos además a la toxicidad, potencia, o eficacia del compuesto o producto. Adicionalmente, se pueden ensayar el efecto del compuesto o producto en el crecimiento, función de barrera, o resistencia del tejido.

En particular, la presente descripción contempla el uso de los equivalentes de piel para una identificación sistemática de alto rendimiento de compuestos de bibliotecas combinatorias (por ejemplo, bibliotecas que contienen más de  $10^4$  compuestos). Las células pueden utilizarse en ensayos de segundos mensajeros que controlan la transducción de señales después de la activación de receptores de la superficie celular o las células se pueden utilizar en ensayos de genes indicadores que controlan las respuestas celulares a nivel de transcripción/traducción o las células se pueden utilizar en ensayos de proliferación celular para controlar la respuesta de crecimiento global/no crecimiento de células a estímulos externos.

En ensayos con segundos mensajeros, los equivalentes de piel se tratan con un compuesto o pluralidad de compuestos (por ejemplo, a partir de una biblioteca combinatoria) y se ensayan para la presencia o ausencia de una respuesta a un segundo mensajero. Las células (por ejemplo, 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, canales controlados por voltaje o alguna otra proteína de interés que participa en una cascada de señalización. Se contempla que al 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 al menos algunos de los compuestos en la biblioteca combinatoria pueden servir como agonistas, antagonistas, activadores o inhibidores de proteína que actúan aguas arriba o aguas abajo de la proteína codificada por el vector en una vía de transducción de señales.

Los ensayos con segundos mensajeros pueden medir las señales fluorescentes de moléculas indicadoras que responden a cambios intracelulares (por ejemplo, concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , potencial de membrana, pH, IP3, AMPc, liberación de ácido araquidónico) debido a la estimulación de los receptores de membrana y canales iónicos (por ejemplo, canales iónicos controlados por ligandos) (Denyer y col., *Drug Discov. Today* 3:323-32 (1998); Gonzales y col., *Drug. Discov. Today* 4:431-39 (1999)). Ejemplos de moléculas indicadoras incluyen, entre otros, 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 cloruros (por ejemplo, SPQ, SPA), indicadores sensibles a potasio (por ejemplo, PBFI), indicadores sensibles a sodio (por ejemplo, SBIF), e indicadores sensibles al pH (por ejemplo, BCECF).

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 por medio de procedimientos conocidos en la materia, incluyendo, entre otros, 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 preferentes, la respuesta (por ejemplo, aumento de 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 %. Del mismo modo, la respuesta máxima registrada después de la adición de un agonista a una muestra que contiene un antagonista conocido o de ensayo es inferior de forma detectable a la respuesta del 100 %.

Los equivalentes de piel obtenidos por el procedimiento de la presente invención también son útiles en ensayos de genes indicadores. Los ensayos de genes indicadores implican el uso de células huésped transfectadas con vectores que codifican un ácido nucleico que comprenden elementos de control de transcripción de un gen diana (es decir, un gen que controla la expresión y función biológica de una enfermedad diana o respuesta inflamatoria) cortados y empalmados a una secuencia codificante de un gen indicador. Por lo tanto, la activación del gen diana da lugar a la activación del producto génico indicador. Esto sirve como indicador de una respuesta, tal como respuesta inflamatoria. Por lo tanto, en algunos ejemplos, la construcción génica indicadora 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 indicador. Los ejemplos de genes indicadores que encuentran uso incluyen, entre otros, cloranfenicol transferasa, fosfatasa alcalina, luciferasas de luciérnaga y bacterianas,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -lactamasa, y proteína fluorescente verde. La producción de estas proteínas, con la excepción de la proteína verde, roja, amarilla o azul fluorescente, se detecta mediante el uso de productos quimioluminiscentes, colorimétricos, o bioluminescentes de sustratos específicos (por ejemplo, X-gal y luciferina). La comparación entre compuestos de actividades conocidas y desconocidas se puede llevar a cabo como se ha descrito previamente.

Los equivalentes de piel encuentran uso para la identificación sistemática de la eficacia de la introducción de fármacos a través de la piel o el efecto de los fármacos dirigidos a la piel. En estos ejemplos, los equivalentes de piel pueden tratarse con el sistema de administración de fármacos o el fármaco, y se ensaya la permeación, penetración, o retención o el fármaco en el equivalente de piel. Los procedimientos para ensayar la permeación del fármaco se proporcionan en Asbill y col., *Pharm Res.* 17(9): 1092- 97 (2000). 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 durante una hora con propilenglicol. A continuación, se añade una suspensión saturada del fármaco modelo en propilenglicol al equivalente de piel. A continuación, se pueden tomar muestras del equivalente de piel a intervalos predeterminados. Los equivalentes de piel se analizan posteriormente por HPLC para determinar la concentración del fármaco en la muestra. Los valores de log P para los fármacos pueden determinarse utilizando el programa ACD (Advanced Chemistry Inc., Ontario, Canadá). Estos procedimientos pueden adaptarse para estudiar la administración de fármacos a través de parches transdérmicos u otros modos de administración.

En otros ejemplos preferentes, los equivalentes dérmicos sembrados, que aún no han experimentado una diferenciación, encuentran uso en ensayos para compuestos que inhiben, aceleran o, en cualquier caso, efectúan la diferenciación de los queratinocitos sembrados.

## 2. Sustratos para cultivar tumores y agentes patológicos

Se contempla que los equivalentes de piel obtenidos por el procedimiento 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 algunos ejemplos, se contempla que los equivalentes de piel de la presente invención se siembran con células malignas. A modo de ejemplo no limitativo, los equivalentes de piel se pueden sembrar con células SCC13y malignas como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.989.837 para proporcionar un modelo de carcinoma de células escamosas humanas. Estos equivalentes de piel sembrados se pueden utilizar a continuación para identificar sistemáticamente compuestos u otras estrategias de tratamiento (por ejemplo, radiación o tomoterapia) para la eficacia contra el tumor en su medio natural. De este modo, algunos ejemplos de la presente descripción proporcionan procedimientos que comprenden proporcionar un equivalente de piel que comprende células malignas o un tumor y al menos un compuesto de ensayo, tratar el equivalente de piel con el compuesto, y analizar el efecto del tratamiento en las células malignas o tumores. En otros ejemplos de la presente descripción, se proporcionan procedimientos que comprenden proporcionar un equivalente de piel que comprende células malignas o un tumor y al menos una terapia de ensayo (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.

En otros ejemplos, los equivalentes de piel se utilizan para cultivar y estudiar patógenos de la piel. A modo de ejemplo no limitativo, los equivalentes de piel se infectan por el virus del papiloma humano (VPH), tal como VPH18. Los procedimientos para preparar equivalentes de piel infectados por VPH se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.994.115. De este modo, algunos ejemplos de la presente descripción proporcionan procedimientos que comprenden proporcionar un equivalente de piel infectado por un patógeno de interés y al menos un compuesto o tratamiento de ensayo y tratar el equivalente de piel con el compuesto o tratamiento de ensayo. En algunos ejemplos preferentes, los procedimientos comprenden analizar además el efecto del compuesto o tratamiento de ensayo sobre el patógeno. Dichos ensayos pueden llevarse a cabo mediante el análisis de la presencia, ausencia o cantidad del patógeno en el sustituto de piel después del tratamiento. Por ejemplo, se puede realizar un ELISA para detectar o cuantificar el patógeno. En algunos ejemplos particularmente preferentes, el patógeno es un patógeno viral, tal como el VPH.

## 3. Cierre de heridas y tratamiento de quemaduras

Los equivalentes de piel obtenidos por los procedimientos de la presente invención encuentran uso en aplicaciones de cierre de heridas y tratamiento de quemaduras. El uso de autoinjertos y aloinjertos para el tratamiento de quemaduras y cierre de heridas se describe en Myers y col., *A. J. Surg.* 170(1):75-83 (1995) y las patentes de Estados Unidos n.º 5.693.332; 5.658.331; y 6.039.760. En algunos ejemplos, los equivalentes de piel se pueden utilizar conjuntamente con sustituciones dérmicas, tales como DERMAGRAFT. En otros ejemplos, los equivalentes de piel se producen utilizando tanto una fuente convencional de queratinocitos (por ejemplo, células NIKS) como queratinocitos del paciente que recibirá el injerto. Por lo tanto, el equivalente de piel contiene queratinocitos de dos fuentes diferentes. En otros ejemplos adicionales, el equivalente de piel contiene queratinocitos de un aislado de

tejido humano. En consecuencia, la presente descripción proporciona procedimientos para el cierre de heridas, incluyendo heridas causadas por quemaduras, que comprende proporcionar un equivalente de piel y un paciente que tiene una herida y tratar el paciente con el equivalente de piel en condiciones tales que se cierre la herida.

#### 4. Terapia génica

5 El equivalente de piel está modificado por ingeniería genética para proporcionar un agente terapéutico a un sujeto. La presente descripción no se limita a la administración de cualquier agente terapéutico particular. De hecho, se contempla que se pueden administrar una variedad de agentes terapéuticos al sujeto, incluyendo, entre otros, enzimas, péptidos, hormonas peptídicas, otras proteínas, ARN ribosómico, ribozimas, y ARN antisentido. Estos agentes terapéuticos se pueden administrar para una variedad de fines, incluyendo, entre otros, el fin de corregir defectos genéticos. En algunos ejemplos preferentes particulares, el agente terapéutico se administra para el fin 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 algunos ejemplos, 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 ejemplos preferentes, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico está unido operativamente a un promotor adecuado. La presente descripción no está limitada al uso de cualquier promotor particular. De hecho, se contempla el uso de una variedad de promotores, incluyendo, entre otros, promotores inducibles, constitutivos, específicos de tejido y específicos de queratinocitos. En algunos ejemplos, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se introduce directamente en los queratinocitos (es decir, por co-precipitación con fosfato de calcio o mediante la transfección con liposomas). En otros ejemplos preferentes, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se proporciona como un vector y el vector se introduce en los queratinocitos por procedimientos conocidos en la materia. En algunos ejemplos, el vector es un vector episomal, tal como un plásmido. En otros ejemplos, el vector se integra en el genoma de los queratinocitos. Ejemplos de vectores que se integran incluyen, entre otros, vectores retrovirales, vectores de virus adenoasociados, y vectores transposones.

#### D. Uso de procedimientos de producción de otros productos sustancialmente exentos de células de capa alimentadora

30 La presente descripción contempla la producción de una variedad de células, estirpes celulares, o productos derivados de células que están sustancialmente exentos de células de capa alimentadora residuales. En ejemplos preferentes, las células o estirpes celulares cultivadas en capas alimentadoras de 3T3 identificadas sistemáticamente con el ensayo de ADN de ratón y el ensayo de proliferación darán lugar a células cultivadas o estirpes celulares que están sustancialmente exentas de células de capa alimentadora. Las células madre sustancialmente exentas de capas alimentadoras se recolectan. Las células madre no humanas específicas de cualquier organismo se pueden utilizar. El tipo de células madre puede ser células madre adultas (por ejemplo, células madre somáticas) o el tipo de células madre puede ser células madre embrionarias no humanas (por ejemplo, células madre totipotentes).

40 El procedimiento de aislamiento de células madre en el documento US 5.843.780 puede utilizarse. En tales ejemplos, el medio para el aislamiento de células madre embrionarias no humanas es "medio ES". El medio ES consiste en medio de Eagle modificado de Dulbecco al 80 % (DMEM; formulación de alto contenido en glucosa, sin piruvato, Gibco ERL), con suero bovino fetal al 20 % (SBF; Hyclone), 0,1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma), solución madre de aminoácidos no esencial al 1 % (Gibco BRL). Preferentemente, los lotes de suero bovino fetal se compararon mediante el ensayo de eficiencia de cultivo en placa clonal de una estirpe celular ES de ratón de bajo pase (ES<sub>lit</sub>), una estirpe celular desarrollada solo para el fin de este ensayo. Los lotes de SBF han de compararse porque se ha descubierto que los lotes varían dramáticamente en su capacidad para apoyar el crecimiento de células embrionarias, pero en cualquier otro procedimiento de ensayo, la competencia de los lotes de SBF para el apoyo de las células embrionarias funcionará como alternativa.

50 Las células ES de primates se aíslan en una capa confluyente de fibroblastos embrionarios murinos en presencia de medio de células ES. Los fibroblastos embrionarios se obtienen preferentemente a partir de fetos de ratones CF1 no consanguíneos de 12 días de edad (Sasco), pero otras cepas se pueden utilizar como alternativa. Las placas de cultivo tisular se tratan preferentemente con gelatina al 0,1 % (tipo I; Sigma).

55 Para los embriones de mono rhesus, se observan diariamente monos adultos hembras rhesus (de más de cuatro años de edad) que demuestran unos ciclos ováricos normales para la evidencia de sangrado menstrual (día 1 del ciclo = el día del inicio del período). Las muestras de sangre se extraen diariamente durante la fase folicular a partir del día 8 del ciclo menstrual, y las concentraciones séricas de la hormona luteinizante se determinan mediante radioinmunoensayo. La hembra se empareja con un mono rhesus macho de fertilidad probada desde el día 9 del ciclo menstrual hasta 48 horas después del pico de la hormona luteinizante; la ovulación se considera como el día siguiente al aumento de la hormona luteinizante. Los blastocistos expandidos se recogen mediante lavado uterino no quirúrgico a los seis días después de la ovulación. Este procedimiento da como resultado habitualmente la recuperación de un promedio de 0,4 a 0,6 embriones viables por mono rhesus por mes, Seshagiri y col. *Am J*

*Primatol* 29: 81-91, 1993.

Para los embriones de tití, los monos tití hembras adultas (mayores de dos años de edad) que demuestran ciclos ováricos regulares se mantienen en grupos familiares, con un macho fértil y hasta cinco descendientes. Los ciclos ováricos son controlados por inyección intramuscular de 0,75 g de cloprostenol, análogo de prostaglandina PGF2 $\alpha$  (Estrumate, Mobay Corp., Shawnee, Kansas.) durante la mitad de la fase lútea tardía. Las muestras de sangre se extraen en el día 0 (inmediatamente antes de la inyección de cloprostenol), y en los días 3, 7, 9, 11, y 13. Las concentraciones de progesterona en plasma se determinan por ELISA. El día de la ovulación se considera como el día anterior a una concentración de progesterona en plasma de 10 ng/ml o más. A los ocho días después de la ovulación, los blastocistos expandidos son recuperados por un procedimiento de lavado uterino no quirúrgico, Thomson y col. "*Non-surgical uterine stage preimplantation embryo collection from the common marmoset*", *J Med Primatol*, 23: 333-336 (1994). Este procedimiento da lugar a la producción media de 1,0 embriones viables por tití por mes.

La zona pelúcida se extrae de los blastocistos mediante una breve exposición a pronasa (Sigma). Para inmunocirugía, los blastocistos están expuestos a una dilución 1:50 de antisuero de conejo anti-células de bazo de tití (por blastocistos de tití) o a una dilución 1:50 de conejo anti-mono rhesus (por blastocistos de mono rhesus) en DMEM durante 30 minutos, a continuación, se lavaron durante 5 minutos tres veces en DMEM, luego se expusieron a una dilución 1:5 de complemento de cobaya (Gibco) durante 3 minutos.

Tras dos lavados adicionales en DMEM, las células trofectorómicas lisadas se eliminan de la masa celular interna intacta (MCI) por pipeteo suave, y la MCI se cultivó en placas en fibroblastos embrionarios inactivados de ratón (3.000 rads de radiación gamma).

Tras 7-21 días, las masas derivadas de la MCI se eliminan de las excrecencias endodérmicas con una micropipeta con observación directa bajo un microscopio estereó, expuestas a tripsina-EDTA al 0,05 % (Gibco) suplementadas con suero de pollo al 1 % durante 3-5 minutos y suavemente disociadas mediante pipeteado suave a través de una micropipeta pulida con llama.

Las células disociadas se volvieron a cultivar en placas en capas alimentadoras embrionarias en medio ES fresco, y se observaron para la formación de colonias. Las colonias que demuestran una morfología similar a ES se seleccionan individualmente, y se separan de nuevo como se ha descrito previamente. La morfología similar a ES se define como colonias compactas que tienen una alta relación núcleo a citoplasma y unos nucleolos prominentes. Las células ES resultantes se dividen así pues habitualmente por tripsinización breve o exposición a solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (sin calcio o magnesio y con 2 mM de EDTA) cada 1-2 semanas a medida que los cultivos se vuelven densos. Las células de pase temprano también se congelan y almacenan en nitrógeno líquido.

Las estirpes celulares pueden cariotiparse con una técnica de bandeó G convencional (tal como en el Laboratorio de Citogenética de la Universidad de Wisconsin, Laboratorio Estatal de Higiene, que proporciona servicios de cariotipo rutinarios) y se compararon con los cariotipos publicados para las especies de primates.

El aislamiento de las estirpes celulares ES de otras especies de primates seguiría un procedimiento similar, excepto que la tasa de desarrollo a blastocistos puede variar algunos días entre las especies, y la tasa de desarrollo de la MCI cultivada variará entre las especies. Por ejemplo, seis días después de la ovulación, los embriones de mono rhesus se encuentran en la etapa de blastocistos expandidos, mientras que los embriones de tití no llegan a la misma etapa hasta 7-8 días después de la ovulación. Las estirpes celulares ES de rhesus se obtuvieron por primera vez mediante la división de las células derivadas de la MCI a los 7-16 días después de la inmunocirugía; mientras que las células ES de tití se obtuvieron con la división inicial a los 7-10 días después de la inmunocirugía. Debido a que otros primates también varían su tasa de desarrollo, el momento de la recogida de embriones, y el momento de la división inicial de la MCI variarán entre las especies de primates, pero las mismas técnicas y las condiciones de cultivo permitirán el aislamiento de células ES.

La descripción contempla producir una variedad de otras células o estirpes celulares sustancialmente exentas de células de capa alimentaria, incluyendo epitelio estratificado de barrera húmeda (por ejemplo, células epiteliales superficiales, células del epitelio urinario); células epiteliales especializadas en la secreción exocrina (por ejemplo, células de las glándulas salivares, células de las glándulas mamarias, células de las glándulas sudoríparas apocrinas, células mucosas del revestimiento del estómago); células especializadas en la secreción de hormonas (por ejemplo, células secretoras de la glándula pituitaria, células secretoras del intestino y el tracto respiratorio, células secretoras de la glándula tiroidea, células secretoras de la glándula adrenal, células secretoras de las gónadas); células epiteliales de absorción intestinal, glándulas exocrinas, y tracto urogenital (por ejemplo, células del borde en cepillo del intestino, células de los conductos estriados de las glándulas exocrinas, células no ciliadas de conductillo eferente); células especializadas en el metabolismo y el almacenamiento (por ejemplo, hepatocitos, células de grasa); células epiteliales que sirven principalmente como función de barrera, revisten el pulmón, intestino, glándulas exocrinas, y el tracto urogenital (por ejemplo, neumocitos tipo 1, células del conducto pancreático, células parietales del glomérulo renal); células epiteliales que revisten cavidades corporales internas cerradas (por ejemplo, células endoteliales vasculares de los vasos linfáticos y sanguíneos, células sinoviales,

células que revisten el espacio endolinfático del oído, células "endoteliales" de la córnea); células ciliadas con función de propulsión (por ejemplo, células de las vías respiratorias, células de oviducto, revestimiento de células endodermias de las cavidades cerebrales); células especializadas en la secreción de la matriz extracelular (por ejemplo, células ameloblastos, fibroblastos, pericitos de capilares sanguíneos, condrocitos, osteoblastos); células contráctiles (por ejemplo, células de músculo esquelético, células del músculo cardíaco, células de músculo liso, células mioepiteliales); células de la sangre y del sistema inmunitario (por ejemplo, glóbulos rojos, macrófagos, neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B); transductores sensoriales (por ejemplo, fotorreceptores, células ciliadas internas del órgano de Corti, células de las papilas gustativas tipo II); neuronas autónomas (por ejemplo, células colinérgicas, células adrenérgicas, células peptidérgicas); células de apoyo de órganos de los sentidos y de neuronas periféricas (por ejemplo, células pilares internas, células de Hensen, células de Schwann, células gliales entéricas); neuronas y células gliales del sistema nervioso central (por ejemplo, células neuronales en general, astrocitos, oligodendrocitos); células lenticulares (por ejemplo, células epiteliales lenticulares anterior, célula fibrosa lenticular); células de pigmento (por ejemplo, melanocitos, células del epitelio pigmentario de la retina); células germinales (por ejemplo, células oogonio, ovocitos, espermatoцитos, espermatoгонios); células enfermeras (por ejemplo, células de folículos ováricos, células de Sertoli, células epiteliales del timo).

## PARTE EXPERIMENTAL

Los siguientes ejemplos se proporcionan a efectos de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención.

En la divulgación experimental siguiente, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar);  $\mu$ M (micromolar); N (Normal); mol (moles); mmol (milimoles);  $\mu$ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos);  $\mu$ g (microgramos); ng (nanogramos); l (litros); ml (mililitros);  $\mu$ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros);  $\mu$ m (micrómetros); nm (nanómetros);  $^{\circ}$ C (grados centígrados); U (unidades), mU (miliunidades); min. (minutos); s (segundos); % (por ciento); kb (kilobase); pb (par de bases); PCR (reacción en cadena de la polimerasa); ASB (albúmina de suero bovino).

### Ejemplo 1

#### Detección de ADN específico de ratón utilizando cebadores de ratón ST051 y ST052

Este ejemplo describe la detección de ADN específico de ratón utilizando los cebadores de ratón ST051 y ST052. Se aisló ADN genómico de ratón (3T3) y células de fibroblastos dérmicos humanos normales (FDHN) para su uso como plantillas de PCR. Se diseñaron cebadores de PCR ST051 (5'-GAATTCATGAAAGTCAGATTAGATC-3', SEQ ID NO: 1) y ST052 (5'-GAATTCATAACCATACAGTTGGCCAACC-3', SEQ ID NO: 2) para amplificar un producto de 285 pares de bases (pb) específico para ADN genómico de ratón (MacGregor, H.C. y Varley, J.M. (1988). *Working with Animal Chromosomes*, 2ª ed., Wiley, Nueva York).

Las reacciones de PCR contenían ADN genómico de célula de ratón (3T3) (123 ng/reacción) o ADN genómico de célula humana (FDHN) (100 ng/reacción). Después de la desnaturalización a 95  $^{\circ}$ C durante 4 minutos, las muestras se sometieron a lo siguiente durante 35 ciclos: desnaturalización a 94  $^{\circ}$ C durante 1 minuto, hibridación a 50  $^{\circ}$ C durante 1 minuto, extensión a 72  $^{\circ}$ C durante 2 minutos. Se siguió una extensión final a 72  $^{\circ}$ C durante 7 minutos por una retención de 4  $^{\circ}$ C.

El producto de 285 pb se amplificó adecuadamente cuando se ensayó ADN genómico de ratón (3T3) con cebadores de ADN específico de ratón ST051 y ST052. Al mismo tiempo, no se detectó ningún producto de PCR en la muestra de ADN genómico de célula humana (FDHN) cuando se analizó con cebadores de ADN específicos de ratón.

### Ejemplo 2

#### Detección de ADN específico de humano utilizando cebadores de PCR de control ST047 y ST035

Este ejemplo describe el uso de un segundo conjunto de cebadores (ST047 (5'-GCCCCGCCCCCTCTTGTCCCC-3', SEQ ID NO: 3) y ST035 (5'-GAGCCGGGGTCATCCGGTG-3', SEQ ID NO: 4) para amplificar un producto específico de 500 pb de ADN genómico humano. Este ejemplo describe asimismo la evaluación sistemática y la identificación de las condiciones óptimas de la hibridación del cebador a la plantilla para conjuntos de cebadores de PCR tanto de ratón como de control.

Las reacciones de PCR contenían cualquier ADN genómico humano (Promega, Madison, WI) (0,5  $\mu$ g/reacción), ADN genómico de célula de ratón (3T3) (250 pg/reacción) o adición de ADN genómico humano (Promega) (0,5  $\mu$ g/reacción) + ADN genómico de célula de ratón (3T3) (250 pg/reacción). Después de la desnaturalización a 95  $^{\circ}$ C durante 5 minutos, las muestras se sometieron a lo siguiente durante 30 ciclos: desnaturalización a 94  $^{\circ}$ C durante 1 minuto, condiciones de hibridación que oscilan entre 50  $^{\circ}$ C-70  $^{\circ}$ C durante 1 minuto, extensión a 72  $^{\circ}$ C durante 2 minutos. Se siguió una extensión final a 72  $^{\circ}$ C durante 7 minutos por una retención de 4  $^{\circ}$ C.

Los cebadores ST047 y ST035 sirven como un conjunto cebador de PCR de control utilizado para verificar la integridad de la plantilla de ADN genómico por su capacidad de amplificación por PCR. Estos cebadores de control

producen productos de PCR de diferentes tamaños que corresponden a cada una de las diferentes especies de ADN genómico ensayado. Los tamaños de producto cebador de PCR de control esperados son de la siguiente manera: 400 pb (ratón), 500 pb y 300 pb (ser humano).

Los cebadores ST047 y ST035 amplificaron específicamente el producto de PCR de 500 pb y 300 pb esperado de la plantilla de ADN genómico humano. Los cebadores de PCR ST051 y ST052 amplificaron específicamente un producto de PCR de 285 pb de una plantilla de ADN genómico de ratón. La intensidad de la banda permaneció relativamente constante con o sin la adición de una adición conocida de ADN genómico humano (0,5 µg). Se identificaron temperaturas de hibridación óptimas de 57,3 °C y 68,6 °C para los respectivos conjuntos de cebadores de PCR específicos de ratón y ser humano.

## Ejemplo 3

### PCR utilizando muestras de biopsia de cultivo de piel

Este ejemplo describe el aislamiento de ADN genómico de muestras de biopsia de STRATAGRAFT (Stratatech Corp., Madison, WI) para una evaluación como una fuente de plantilla de ADN genómico en los análisis de PCR descritos en los Ejemplos 1 y 2. El ADN genómico total se aisló de la biopsia con sacabocados (MacGreagor, H.C. (1988) en: *Working with Animal Chromosomes*, 2ª ed., Wiley, Nueva York) combinada del mismo STRATAGRAFT y se utilizó como plantilla para la amplificación de PCR utilizando los cebadores de control ST047 y ST035.

Las plantillas de ADN genómico para las reacciones de PCR eran una de las siguientes: ADN genómico de célula de ratón (3T3); ADN genómico de célula humana (NIKS); ADN genómico humano (Promega) (0,5 µg/reacción); adición conocida de ADN genómico humano (Promega) (0,5 µg/reacción) + ADN genómico de célula de ratón (3T3) (intervalo 10-250 pg/reacción); ADN genómico de STRATAGRAFT (0,5 µg/reacción).

Después de la desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, las muestras se sometieron a lo siguiente durante 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 57,3 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 2 minutos. Se siguió una extensión final a 72 °C durante 7 minutos por una retención de 4 °C.

Se descubrió que la cantidad y la integridad de ADN genómico aislado de las muestras de biopsia de STRATAGRAFT eran suficientes para el análisis en un ensayo de PCR. Los cebadores de control demostraron la capacidad de amplificar secuencias genómicas humanas de ADN genómico de biopsia de STRATAGRAFT. Estos resultados confirman el uso de estos cebadores de control como control de PCR interno confiable para validar la amplificación de muestras de ADN genómico.

## Ejemplo 4

### Evaluación de límites de detección de ADN específico de ratón

Este ejemplo describe la evaluación de los límites de detección de ADN específico de ratón de este ensayo en una reacción de PCR que contiene 0,5 µg de ADN genómico humano total.

Las plantillas de ADN genómico para las reacciones de PCR eran una de las siguientes: ADN genómico humano (Promega) (0,5 µg/reacción); ADN genómico de célula de ratón (3T3) (123 ng/reacción); adición conocida de ADN genómico humano (Promega) (0,5 µg/reacción) + ADN genómico de célula de ratón (3T3) (intervalo de 25-500 pg/reacción). Se utilizaron cebadores de PCR específicos de ratón ST051 y ST052.

Después de la desnaturalización a 95 °C durante 4 minutos, las muestras se sometieron a lo siguiente durante 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 55 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 2 minutos. Se siguió una extensión final a 72 °C durante 10 minutos por una retención de 4 °C.

Los resultados indicaron que el límite de detección de ADN de ratón es de 250 pg de ADN genómico de ratón en una reacción de PCR que contiene 0,5 µg de ADN genómico humano total. Se puede utilizar la modificación de las condiciones de ensayo de PCR específicas (por ejemplo, el número de ciclos) para mejorar el límite de detección de ADN específico de ratón.

## Ejemplo 5

### Variabilidad y reproducibilidad del ensayo

Este ejemplo describe una investigación de la variabilidad y reproducibilidad del ensayo en lo siguiente:

- 1) Preparaciones de ADN de biopsia múltiple de la misma muestra de STRATAGRAFT.
- 2) Múltiples muestras de STRATAGRAFT del mismo lote de producción.
- 3) Múltiples muestras del mismo lote de STRATAGRAFT por diferentes operadores de producción.

Las plantillas de ADN genómico para las reacciones de PCR eran una de las siguientes: ADN genómico de STRATAGRAFT (0,5 µg/reacción); ADN genómico humano (Promega) (0,5 µg/reacción); adición conocida de ADN

genómico humano (Promega) (0,5 µg/reacción) + ADN genómico de célula de ratón (3T3) (100 o 250 pg/reacción). Se utilizaron cebadores de PCR específicos de ratón ST051 y ST052, además, los cebadores de control ST047 y ST035 se utilizaron asimismo en reacciones paralelas.

Después de la desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, las muestras se sometieron a lo siguiente durante 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 61 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 2 minutos. Se siguió una extensión final a 72 °C durante 7 minutos por una retención de 4 °C.

Únicamente se detectó una ligera variabilidad en la cantidad de producto de PCR como resultado de múltiples aislamientos de ADN de STRATAGRAFT, preparaciones de STRATAGRAFT u operadores de producción de STRATAGRAFT. La variación observada de producto de PCR no es significativa y se espera como un resultado normal de un ensayo de PCR semicuantitativa.

## Ejemplo 6

### Valoración de las células de ratón

Este ejemplo describe la verificación de los límites de detección que se calcularon previamente utilizando equivalentes de ADN de ratón añadiendo un número conocido de células 3T3 de ratón a un número predeterminado de células FDHN. Se valoró un porcentaje decreciente de células de ratón en un número constante de células FDHN. Se aisló ADN genómico de estas poblaciones celulares para un análisis subsiguiente de PCR. Las intensidades de los productos de PCR de las poblaciones celulares mezcladas se compararon con las obtenidas mezclando cantidades conocidas de ADN genómico de ratón con ADN genómico humano.

Una estimación semicuantitativa de ADN específico de célula de ratón se basa en  $3,5 \times 10^{-12}$  g de ADN de ratón por conjunto de cromosomas haploides (MacGregor y Varley, 1988). Por lo tanto, 250 pg de ADN genómico de ratón equivalen a 35,7 equivalentes de ADN de célula de ratón. Una muestra de plantilla de ADN genómico humano de 0,5 µg es equivalente a 90.000 células humanas.

Las plantillas de ADN genómico para las reacciones de PCR eran una de las siguientes: ADN genómico de población celular mixta (FDHN/3T3) (0,5 µg/reacción); ADN genómico de célula humana (FDHN) (0,5 µg/reacción); ADN genómico de célula de ratón (3T3) (0,5 µg/reacción); ADN genómico humano (Promega) (0,5 µg/reacción); adición conocida de ADN genómico humano (Promega) (0,5 µg/reacción) + ADN genómico de célula de ratón (3T3) (3,1-250 pg/reacción). Se utilizaron cebadores de PCR específicos de ratón ST051 y ST052, además, se utilizaron asimismo cebadores de control ST047 y ST035 en reacciones paralelas.

Después de la desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, las muestras se sometieron a lo siguiente durante 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 61 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 2 minutos. Se siguió una extensión final a 72 °C durante 7 minutos por una retención de 4 °C.

La intensidad de los productos de PCR obtenidos utilizando ADN aislado de poblaciones celulares mixtas se comparó con la intensidad obtenida de muestras adicionadas de equivalente de ADN de ratón, como se presenta en las Tablas 2 y 3.

Estos resultados demostraron la capacidad del análisis de PCR capaz de detectar menos de cuatro células de ratón en un fondo de aproximadamente 90.000 células humanas. Por consiguiente, este ensayo detectará células residuales de ratón a bajo nivel en presencia de células humanas.

**Tabla 2: Resultados de la detección utilizando células de ratón adicionadas**

| Número de células de ratón adicionadas en 90.000 células humanas | Resultado de PCR |
|------------------------------------------------------------------|------------------|
| 265 células                                                      | Detectado        |
| 132 células                                                      | Detectado        |
| 66,1 células                                                     | Detectado        |
| 13,2 células                                                     | Detectado        |
| 6,6 células                                                      | Detectado        |
| 3,3 células                                                      | Detectado        |
| 0 (sin células de ratón)                                         | No detectado     |

Tabla 3: Resultados de la detección utilizando ADN de ratón aislado adicionado

| Cantidad de ADN genómico de ratón adicionado en 0,5 µg de ADN genómico humano | Equivalentes celulares aproximados | Resultado de PCR |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------|
| 250 pg                                                                        | 36                                 | Detectado        |
| 125 pg                                                                        | 18                                 | Detectado        |
| 62,5 pg                                                                       | 9                                  | Detectado        |
| 12,5 pg                                                                       | 2                                  | Detectado        |
| 6,25 pg                                                                       | 1                                  | No detectado     |
| 3,125 pg                                                                      | 0,5                                | No detectado     |
| 0 (sin ADN de ratón)                                                          | 0                                  | No detectado     |

**Ejemplo 7****Reactividad cruzada de cebadores específicos de ratón**

- 5 Este ejemplo demuestra que no se detectó ADN de no ratón con cebadores específicos de ratón en muestras de no ratón.

Las plantillas de ADN genómico para las reacciones de PCR eran una de las siguientes: ADN genómico humano (Promega) (0,5 µg/reacción); ADN genómico humano (Clontech) (0,5 µg/reacción); ADN genómico de rata (Clontech) (0,5 µg/reacción); ADN genómico de rata (Stratatech) (0,5 µg/reacción); ADN genómico de ratón (Clontech) (0,5 µg/reacción); ADN genómico de célula de ratón (3T3) (0,5 µg/reacción); ADN genómico de célula de ratón (3T3) (250 pg/reacción); ADN genómico de ratón (Clontech) (250 pg/reacción); ADN genómico de STRATAGRAFT A (0,5 µg/reacción); ADN genómico de STRATAGRAFT B (0,5 µg/reacción); control negativo (sin ADN).

Después de la desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, las muestras se sometieron a lo siguiente durante 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, hibridación a 61 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 2 minutos. Se siguió una extensión final a 72 °C durante 7 minutos por una retención de 4 °C.

Los cebadores específicos de ratón ST051 y ST052 demostraron la ausencia de reactividad cruzada o amplificación no específica de secuencias de ADN genómico de rata y humano. Por lo tanto, estos cebadores son específicos para secuencias de ADN genómico de ratón.

**Ejemplo 8****20 Determinación del número óptimo de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C por cm<sup>2</sup> para la detección de células 3T3 proliferantes.**

Este ejemplo describe los experimentos utilizados para determinar el número óptimo de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C por cm<sup>2</sup>. Durante la producción de STRATAGRAFT, se utilizaron aproximadamente 7,5 x 10<sup>6</sup> células 3T3 tratadas con mitomicina-C inactivadas por replicación durante la iniciación de NIKS y se utilizaron aproximadamente 25 x 10<sup>6</sup> células de 3T3 tratadas con mitomicina-C inactivadas por replicación durante la expansión de NIKS. 3T3 de capas alimentadoras tratadas con mitomicina-C inactivadas por replicación se cultivaron en placas a una densidad celular que oscila entre 22.700 células/cm<sup>2</sup> según BR14 y 27.300 células/cm<sup>2</sup> según BR13. Para determinar el número óptimo de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C por cm<sup>2</sup> para la detección de células 3T3 proliferantes, se examinaron cuatro densidades celulares diferentes de 3.130 células/cm<sup>2</sup>, 7.810 células/cm<sup>2</sup>, 15.630 células/cm<sup>2</sup> y 31.250 células/cm<sup>2</sup> utilizando placas de 96 pocillos. Estas densidades corresponden a 1.000, 2.500, 5.000 y 10.000 fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C por pocillo (0,32 cm<sup>2</sup>/pocillo).

Para determinar qué densidad celular sería el mejor soporte de proliferación y posterior detección de cualquier fibroblasto de ratón 3T3 capaz de replicación, se combinaron células 3T3 proliferantes no tratadas (células nunca tratadas con mitomicina-C) con fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C en combinaciones específicas como se muestra en la Figura 1. Se utilizaron cinco placas de 96 pocillos, un total de 153,6 cm<sup>2</sup> por densidad celular ensayada, cada una de estas placas de 96 pocillos contenía 25 células 3T3 proliferantes, no tratadas, diluidas en la medida en que cada pocillo tenía aproximadamente una de cada cuatro posibilidades de contener un único fibroblasto de ratón 3T3 capaz de replicación.

40 En este análisis también se incluyó un control tanto para la dilución apropiada de fibroblastos 3T3 competentes para

replicación como para el nivel de proliferación de 3T3 en ausencia de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C. A tal fin, se utilizaron cinco placas de 96 pocillos que contenían únicamente 25 células 3T3 proliferantes, no tratadas. Las células 3T3 proliferantes se diluyeron en la medida en que cada pocillo de las placas de control tenía aproximadamente una de cada cuatro posibilidades de contener un único fibroblasto de ratón 3T3 capaz de replicación.

Se mantuvieron cultivos de células 3T3M1 proliferantes, competentes para replicación, una variante resistente a la tioguanina de la línea 3T3 de fibroblastos de ratón suizo, como se ha descrito previamente (Allen Hoffman, B.L. y Rheinwald, J.G. (1994) 81 *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 7802-7806) en el medio de cultivo compuesto por el medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero fetal de ternera al 10 %. Las células 3T3 criopreservadas tratadas con mitomicina-C se prepararon de acuerdo con el protocolo de Stratatech BR10. En todos los experimentos, se eliminó el medio agotado y se reemplazó con 200 µl de medio fresco por pocillo cada semana durante la incubación. El examen microscópico para verificar una distribución celular uniforme se completó tras la primera semana de incubación. Se completó asimismo un examen riguroso para detectar cualquier evidencia de contaminación bacteriana a lo largo del curso del cultivo. El área de la superficie limitada para el crecimiento celular en el formato de placa de 96 pocillos (0,32 cm<sup>2</sup>/pocillo) facilitó la orientación durante el examen microscópico y la migración 3T3 proliferativa restringida.

Tras tres semanas de incubación, las muestras se fijaron durante 30 minutos en formalina al 10 % y se tiñeron durante la noche con una solución azul de metileno al 0,2 %. El azul de metileno tiñe compuestos celulares basófilos, principalmente ácidos nucleicos, tanto en células 3T3 competentes para replicación como en células 3T3 incompetentes para replicación (Scragg, M.A. y Ferreira, L.R. (1991) 198:1 *Anal. Biochem.* 80-85). Las placas teñidas se lavaron extensamente con agua para eliminar el exceso de azul de metileno y se dejaron secar al aire.

Cada pocillo teñido con azul de metileno se examinó tanto visualmente como microscópicamente para detectar cualquier evidencia de proliferación de 3T3. La tinción permite una rápida identificación de las células y ayuda al examen microscópico de la morfología celular. La morfología celular de una célula 3T3 que se prolifera activamente es muy diferente de la de una célula 3T3 tratada con mitomicina-C inactivada para replicación facilitando la distinción clara entre estos dos estados. Las células 3T3 proliferantes están asociadas a colonias y son de apariencia pequeña y fusiforme. Por el contrario, las células 3T3 tratadas con mitomicina-C inactivadas para replicación son grandes y de apariencia plana. En base a la identificación microscópica y a la clasificación por la apariencia morfológica, cada pocillo se registró individualmente como positivo o negativo para la proliferación de 3T3.

Se completaron dos réplicas del ensayo comparando la detección de la proliferación de 3T3 dentro de un fondo de cuatro densidades diferentes de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C (1.000, 2.500, 5.000 y 10.000 células por pocillo) con la detección de proliferación de 3T3 en un fondo de control de 0 fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C por pocillo (0,32 cm<sup>2</sup>/pocillo). Al igual que se diseñó, se utilizaron cinco placas de 96 pocillos por densidad celular ensayada, cada una de estas placas de 96 pocillos contenía 25 células 3T3 proliferantes, no tratadas, diluidas en la medida en que cada pocillo tenía aproximadamente una de cada cuatro posibilidades de contener un único fibroblasto de ratón 3T3 capaz de replicación.

Para verificar que el procedimiento experimental dio como resultado una distribución celular uniforme, el número de células 3T3 proliferantes detectadas se analizó inicialmente sobre una base por placa. El número medio de pocillos positivos por placa de 96 pocillos se determinó para cada nivel de fondo ensayado de células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo (Tabla 4). El número medio de pocillos positivos por placa varió con la densidad celular, no obstante, los valores de desviación estándar para cada conjunto de placas examinadas eran notablemente consistentes. Esta consistencia indicó que los procedimientos resultaron en una distribución relativamente uniforme de fibroblastos 3T3 proliferativos, competentes para replicación que no se vieron afectados por las variables de densidad celular.

**Tabla 4: Número promedio de pocillos positivos para la proliferación de 3T3 por placa de 96 pocillos para cada condición ensayada**

| Número de células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo (0,32 cm <sup>2</sup> ) | Réplica 1 |            | Réplica 2 |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------|-----------|------------|
|                                                                                     | Promedio  | Desv. Est. | Promedio  | Desv. Est. |
| <b>0 células/pocillo</b><br>(0 células/cm <sup>2</sup> )                            | 11,4      | 3,3        | 13,8      | 4,4        |

(continuación)

| Número de células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo (0,32 cm <sup>2</sup> ) | Réplica 1 |            | Réplica 2 |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------|-----------|------------|
|                                                                                     | Promedio  | Desv. Est. | Promedio  | Desv. Est. |
| <b>1.000 células/pocillo</b><br>(3.130 células/cm <sup>2</sup> )                    | 17,8      | 3,6        | 21        | 4,1        |
| <b>2.500 células/pocillo</b><br>(7.810 células/cm <sup>2</sup> )                    | 20        | 4,3        | 23,8      | 3,3        |
| <b>5.000 células/pocillo</b><br>(15.630 células/cm <sup>2</sup> )                   | 19        | 3,2        | 24,2      | 5,2        |
| <b>10.000 células/pocillo</b><br>(31.250 células/cm <sup>2</sup> )                  | 15,2      | 3,6        | 20,2      | 2,9        |

Se analizaron los datos de la Tabla 4 para comparar la eficiencia de formación de colonias (EFC) de células 3T3 proliferativas cultivadas en placas en cada condición de densidad de células 3T3 tratadas con mitomicina-C (Tabla 5). La comparación de las eficiencias de formación de colonias en cada nivel de fondo ensayado se representa en la Figura 2. Las densidades celulares de 2.500 y 5.000 fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C por pocillo (7.810 y 15.630 células/cm<sup>2</sup>) parecen soportar la proliferación y posterior detección de fibroblastos de ratón 3T3 capaces de replicación igualmente bien y mejor que las otras tres densidades celulares ensayadas.

**Tabla 5: Comparación de los valores de eficiencia de formación de colonias para cada condición ensayada.**

Comparación del número de pocillos positivos para la proliferación de 3T3 con el número teórico de células 3T3 proliferativas añadidas a cada condición de ensayo.

| Número de células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo (0,32 cm <sup>2</sup> ) | Réplica 1           |               |      | Réplica 2          |               |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------|------|--------------------|---------------|------|
|                                                                                     | Pocillos positivos  | Total posible | EFC  | Pocillos positivos | Total posible | EFC  |
| <b>0 células/pocillo</b><br>(0 células/cm <sup>2</sup> )                            | 57                  | 125           | 46 % | 69                 | 125           | 55 % |
| <b>1.000 células/pocillo</b><br>(3.130 células/cm <sup>2</sup> )                    | 89                  | 125           | 71 % | 105                | 125           | 84 % |
| <b>2.500 células/pocillo</b><br>(7.810 células/cm <sup>2</sup> )                    | 100                 | 125           | 80 % | 119                | 125           | 95 % |
| <b>5.000 células/pocillo</b><br>(15.630 células/cm <sup>2</sup> )                   | 76                  | 100           | 76 % | 121                | 125           | 97 % |
| <b>10.000 células/pocillo</b><br>(31.250 células/cm <sup>2</sup> )                  | 76                  | 125           | 61 % | 101                | 125           | 81 % |
|                                                                                     | <b>Promedio EFC</b> |               |      | <b>Desv. Est.</b>  |               |      |
| <b>0 células/pocillo</b><br>(0 células/cm <sup>2</sup> )                            | 50 %                |               |      | 7 %                |               |      |

(continuación)

|                                                                    | Promedio EFC | Desv. Est. |
|--------------------------------------------------------------------|--------------|------------|
| <b>1.000 células/pocillo</b><br>(3.130 células/cm <sup>2</sup> )   | 78 %         | 9 %        |
| <b>2.500 células/pocillo</b><br>(7.810 células/cm <sup>2</sup> )   | 88 %         | 11 %       |
| <b>5.000 células/pocillo</b><br>(15.630 células/cm <sup>2</sup> )  | 86 %         | 15 %       |
| <b>10.000 células/pocillo</b><br>(31.250 células/cm <sup>2</sup> ) | 71 %         | 14 %       |

La eficiencia de formación de colonias de fibroblastos 3T3 competentes para replicación se vio afectada por la densidad celular de células 3T3 tratadas con mitomicina-C inicialmente cultivadas en placas. Para las células 3T3 competentes para replicación cultivadas en placas en ausencia de células 3T3 tratadas con mitomicina-C, se obtuvo una eficiencia de formación de colonias del 50 %. Un incremento de 1,5 veces de la eficiencia de formación de colonias se produjo a partir de células 3T3 competentes para replicación cultivadas en placas en presencia de 3.130 células 3T3 tratadas con mitomicina-C/cm<sup>2</sup>. Para 7.810 y 15.630 células 3T3 tratadas con mitomicina-C/cm<sup>2</sup>, se obtuvo un incremento de 1,7 veces de la eficiencia de formación de colonias. Se obtuvo un incremento de 1,4 veces de la eficiencia de formación de colonias para células 3T3 cultivadas en placas en presencia de 31.250 células 3T3 tratadas con mitomicina-C/cm<sup>2</sup>.

Teniendo en cuenta estos resultados, la densidad óptima de cultivo en placas de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C por cm<sup>2</sup> para la detección de células 3T3 proliferantes parece estar entre 7.810 y 15.630 células/cm<sup>2</sup>. En base a este hallazgo, y la preferencia para aproximar las densidades celulares utilizadas en un cultivo monocapa de células NIKS para la producción de STRATAGRAFT, se determinó que la densidad celular de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C que se utilizan para la detección de células 3T3 proliferantes era de  $1,56 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

### Ejemplo 9

#### Determinación de la sensibilidad de detección de la proliferación de 3T3

Este ejemplo describe cómo se determinó la sensibilidad de detección de la proliferación de células de fibroblastos 3T3. Para determinar la sensibilidad de detección de 3T3 proliferante, se completó después una experimentación adicional como se describe en la Figura 3 empleando la densidad celular óptima establecida previamente. Para esta evaluación, se sembraron un número específico de fibroblastos 3T3 proliferantes conocidos, competentes para replicación (nunca tratados con mitomicina-C) en un número específico de células 3T3 tratadas con mitomicina-C por cm<sup>2</sup> a partir de varias preparaciones de fibroblastos 3T3 criopreservados tratados con mitomicina-C. Se incluyeron cultivos de control en este experimento para determinar el nivel de proliferación de 3T3 competente para replicación en ausencia de células 3T3 tratadas con mitomicina-C. Se cultivaron en placas los cultivos de células 3T3 tratadas con mitomicina-C únicamente para controlar los posibles niveles de fondo de la proliferación de 3T3 que surgen de la inactivación por replicación incompleta. En este estudio, se utilizaron tres lotes separados de células 3T3 criopreservadas tratadas con mitomicina-C.

En este experimento, 5.000 fibroblastos de ratón 3T3 inactivados por replicación se cultivaron en placas en cada pocillo de cinco placas de 96 pocillos, conteniendo cada una de estas placas de 96 pocillos 25 células 3T3 proliferantes, no tratadas. Las células 3T3 proliferantes se diluyeron en la medida en que cada pocillo tenía aproximadamente una de cada cuatro posibilidades de contener un único fibroblasto de ratón 3T3 competente para replicación. Los cultivos se mantuvieron durante tres semanas para permitir la proliferación de células 3T3 competentes para replicación.

Se incluyeron en este análisis cultivos para controlar el nivel de proliferación de 3T3 en ausencia de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C. Para tal fin, se utilizaron placas de 96 pocillos que contenían 25 células 3T3 proliferantes, no tratadas. Las células 3T3 proliferantes se diluyeron en la medida en que cada pocillo de las placas de control tenía aproximadamente una de cada cuatro posibilidades de contener un único fibroblasto de ratón 3T3 competente para replicación.

5.000 fibroblastos de ratón 3T3 tratados con mitomicina-C se cultivaron en placas en cada pocillo de cinco placas de

96 pocillos y se cultivaron durante tres semanas para permitir, si está presente, la proliferación de células 3T3 competentes para replicación. La evidencia de la proliferación de 3T3 indicaría inactivación mitótica incompleta en la población celular de un lote dado.

5 Se mantuvieron fibroblastos 3T3 como se describe en el experimento previo. El examen para la proliferación de 3T3 se completó también como se ha descrito anteriormente.

10 Para determinar la sensibilidad de detección de la proliferación de 3T3, se examinaron muestras que contenían células 3T3 competentes para replicación cultivadas en placas en un fondo de 5.000 células 3T3 tratadas con mitomicina-C por pocillo para detectar cualquier evidencia de proliferación de 3T3. Ambos conjuntos de cultivos de control se examinaron también para la proliferación de 3T3. La Tabla 6 muestra el número de pocillos que resultaron positivos para la proliferación de 3T3 para cada placa experimental y de control.

**Tabla 6: Número de pocillos positivos detectados por placa experimental.** Los pocillos que resultaron positivos para la proliferación de 3T3 se registran para cada placa examinada. Un asterisco indica un cultivo que no se cultiva en placas al inicio del experimento.

| Identificación por lotes | Proliferación de 3T3 en presencia de células 3T3 tratadas con mitomicina C |    |    |    |    | Control de la proliferación de 3T3 en ausencia de células 3T3 tratadas con mitomicina C |    |    |    |    | Control de la proliferación en la población celular 3T3 tratadas con mitomicina C |   |   |   |   |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|-----------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|---|
|                          | A                                                                          | B  | C  | D  | E  | A                                                                                       | B  | C  | D  | E  | A                                                                                 | B | C | D | E |
| FF-121001-SCO            | 20                                                                         | 18 | 16 | 14 | 21 | 11                                                                                      | 8  | *  | *  | *  | 0                                                                                 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| FF-031102-06             | 29                                                                         | 26 | 18 | 22 | 20 | 12                                                                                      | 9  | *  | *  | *  | 0                                                                                 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| FF-120301-SCO            | 17                                                                         | 31 | 23 | 23 | 27 | 15                                                                                      | 12 | 10 | 11 | 21 | 1                                                                                 | 0 | 0 | 0 | 0 |

15 El número de pocillos que resultaron positivos en los cultivos que controlaban la proliferación de 3T3 de fondo se restó del número total de pocillos positivos encontrados en las placas experimentales (Tabla 7). Los valores de eficiencia de formación de colonias resultantes para las células 3T3 proliferativas cultivadas en placas en la densidad óptima de células 3T3 tratadas con mitomicina-C se calcularon en base a estos valores ajustados (Tabla 8).

20 **Tabla 7: Número de pocillos positivos ajustados por placa experimental.** El número de pocillos positivos para la proliferación de 3T3 (ajustados para los niveles de proliferación de 3T3 de fondo) se registran para cada placa examinada.

| Identificación por lotes | Proliferación de 3T3 en presencia de células 3T3 tratadas con mitomicina C |                               |                              | Control de la proliferación de 3T3 en ausencia de células 3T3 tratadas con mitomicina C |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Ajustados                | Pocillos positivos experimentales                                          | Pocillos positivos de control | Pocillos positivos ajustados | Pocillos positivos                                                                      |
| FF-121001-SCO            | 89                                                                         | 0                             | 89                           | 19                                                                                      |
| FF-031102-06             | 115                                                                        | 2                             | 113                          | 21                                                                                      |
| FF-120301-SCO            | 121                                                                        | 1                             | 120                          | 69                                                                                      |

**Tabla 8: Comparación de los valores de eficiencia de formación de colonias para cada lote ensayado.**

Comparación del número de pocillos positivos para la proliferación de 3T3 (ajustados para los niveles de proliferación de 3T3 de fondo) con el número teórico de células proliferativas 3T3 añadidas a cada lote ensayado.

| Identificación por lotes | Proliferación de 3T3 en presencia de células 3T3 tratadas con mitomicina-C |               |            | Control de la proliferación de 3T3 en ausencia de células 3T3 tratadas con mitomicina-C |               |            |
|--------------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------|
| Ajustados                | Pocillos positivos (ajustados)                                             | Total posible | EFC        | Pocillos positivos (ajustados)                                                          | Total posible | EFC        |
| FF-121001-SCO            | 89                                                                         | 125           | 71 %       | 19                                                                                      | 50            | 38 %       |
| FF-031102-06             | 113                                                                        | 125           | 90 %       | 21                                                                                      | 50            | 42 %       |
| FF-120301-SCO            | 120                                                                        | 125           | 96 %       | 69                                                                                      | 125           | 55 %       |
|                          | Promedio EFC                                                               |               | Desv. Est. | Promedio EFC                                                                            |               | Desv. Est. |
|                          | 86 %                                                                       |               | 13 %       | 45 %                                                                                    |               | 9 %        |

- 5 Para este examen, se determinó que la eficiencia de formación de colonias para células 3T3 competentes para replicación cultivadas en placa en presencia de  $1,56 \times 10^4$  células 3T3 tratadas con mitomicina-C/cm<sup>2</sup> era del 86 %  $\pm$  13 %. Se calculó una eficiencia de formación de colonias de 45 %  $\pm$  9 % para células 3T3 competentes para replicación cultivadas en placas en ausencia de células 3T3 tratadas con mitomicina-C. Este incremento de casi 2 veces la eficiencia de formación de colonias cuando se compara la detección de células 3T3 competentes para replicación a una densidad celular de  $1,56 \times 10^4$  fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C/cm<sup>2</sup> con la de células 3T3 competentes para replicación cultivadas en ausencia de fibroblastos 3T3 tratados con mitomicina-C es consistente con observaciones previas (véase la Tabla 5).

15 Estos números tienen en cuenta el nivel muy bajo de proliferación de 3T3 de fondo detectada en dos de los tres lotes ensayados. La proliferación de 3T3 indica que los lotes afectados no estaban completamente inactivados para replicación. Estos resultados refuerzan asimismo que un nivel muy bajo de proliferación de 3T3 (por ejemplo en el caso de una célula competente para replicación de  $2,4 \times 10^6$  células examinadas) se detecta utilizando los parámetros establecidos para estos ensayos.

20 Para calcular la sensibilidad de detección de la proliferación de 3T3 para este conjunto de experimentos se emplearon dos valores, la eficiencia de formación de colonias en la densidad celular óptima y el número total de células examinadas. Se examinaron los valores de eficiencia de formación de colonias resultantes y se descubrió que eran 86 %  $\pm$  13 %. Por lo tanto, una única célula 3T3 competente para replicación tiene una probabilidad del 73 % al 99 % de establecer una colonia 3T3 detectable, proliferante en este entorno celular específico. El examen de  $2,4 \times 10^6$  células tratadas con mitomicina-C, utilizando una probabilidad del 73 % de detección por célula proliferativa, da como resultado una sensibilidad de detección de la proliferación de 3T3 de 1 en  $1,75 \times 10^6$  células.

## 25 Ejemplo 10

### Establecimiento de los parámetros para el procedimiento de ensayo: detección de la proliferación en lotes de 3T3 criopreservados tratados con mitomicina-C

30 Este ejemplo describe los experimentos utilizados para establecer los parámetros que rodean la detección de la proliferación en lotes de 3T3 criopreservados tratados con mitomicina-C. Para eliminar un lote de células 3T3 tratadas con mitomicina-C para su uso en la producción, se ha de verificar la inactivación mitótica completa. Un nivel de "proliferación de 3T3 no detectada" (dentro de los límites de sensibilidad entendidos del ensayo) es el único criterio aceptable para este procedimiento de ensayo. Para asegurar la detección, se proporcionará tiempo adicional extendiendo el tiempo original de mantenimiento del cultivo de tres semanas a un total de cinco semanas.

35 El control positivo para el procedimiento de ensayo ha de incorporar células 3T3 competentes para replicación en el fondo apropiado de células tratadas con mitomicina-C. El control positivo ha de permitir asimismo niveles adecuados de detección de la proliferación de 3T3 entre tres a cinco semanas después del cultivo en placas. Por lo tanto, se empleará un control positivo de un número específico de fibroblastos 3T3 proliferativos por cultivo en el procedimiento de ensayo.

40 El número de fibroblastos 3T3 criopreservados tratados con mitomicina-C que han de ensayarse en el procedimiento de ensayo final para la liberación de lote se basa en el formato elegido y la sensibilidad de detección de la proliferación de 3T3. Utilizando matraces para cultivo tisular de 225 cm<sup>2</sup> cultivados en placas en  $1,56 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> para el procedimiento de ensayo, el número total de células por matraz examinado sería de  $3,5 \times 10^6$

células.

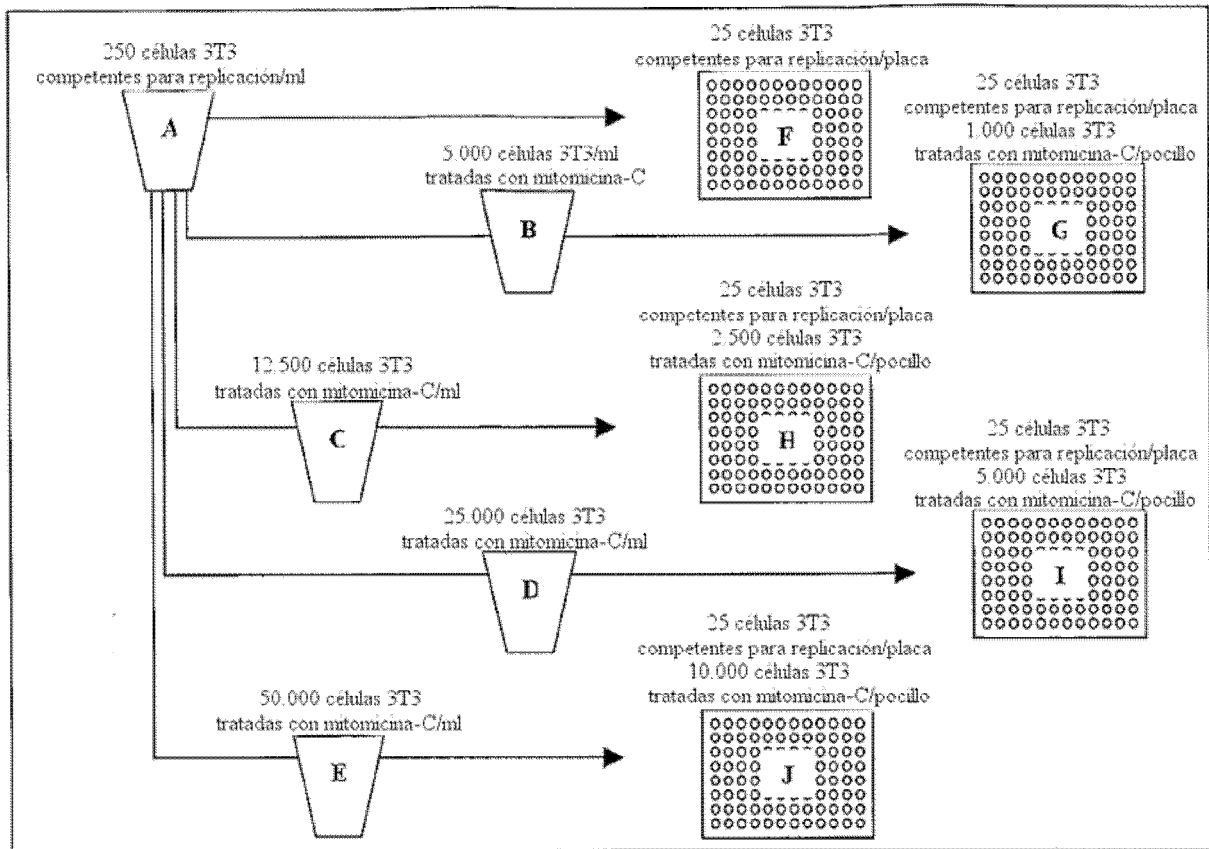
5 Se ha establecido que una única célula 3T3 competente para replicación tiene una probabilidad del 73 % al 99 % de establecer una colonia 3T3 detectable, proliferante en este entorno celular específico. Por lo tanto, el examen de  $7 \times 10^6$  células tratadas con mitomicina-C, con al menos un 73 % de probabilidad de detección por célula proliferativa, da como resultado una sensibilidad de detección de la proliferación de 3T3 de 1 en  $5,1 \times 10^6$  células.

10 El número de equivalentes de ADN celular potencialmente permisible en una dosis no es más de  $1,45 \times 10^4$  equivalentes de ADN celular. Por lo tanto, el total de  $5,1 \times 10^6$  células supera el número de equivalentes de ADN celular potencialmente permisible de una dosis en aproximadamente 350 veces. Además, el ensayo de  $7 \times 10^6$  células proporciona un intervalo de confianza del 95 % ya que no hay células competentes para replicación en  $1,7 \times 10^6$  células, lo que excede el número de equivalentes de ADN de célula 3T3 permisible por dosis de STRATAGRAFT en más de 117 veces.

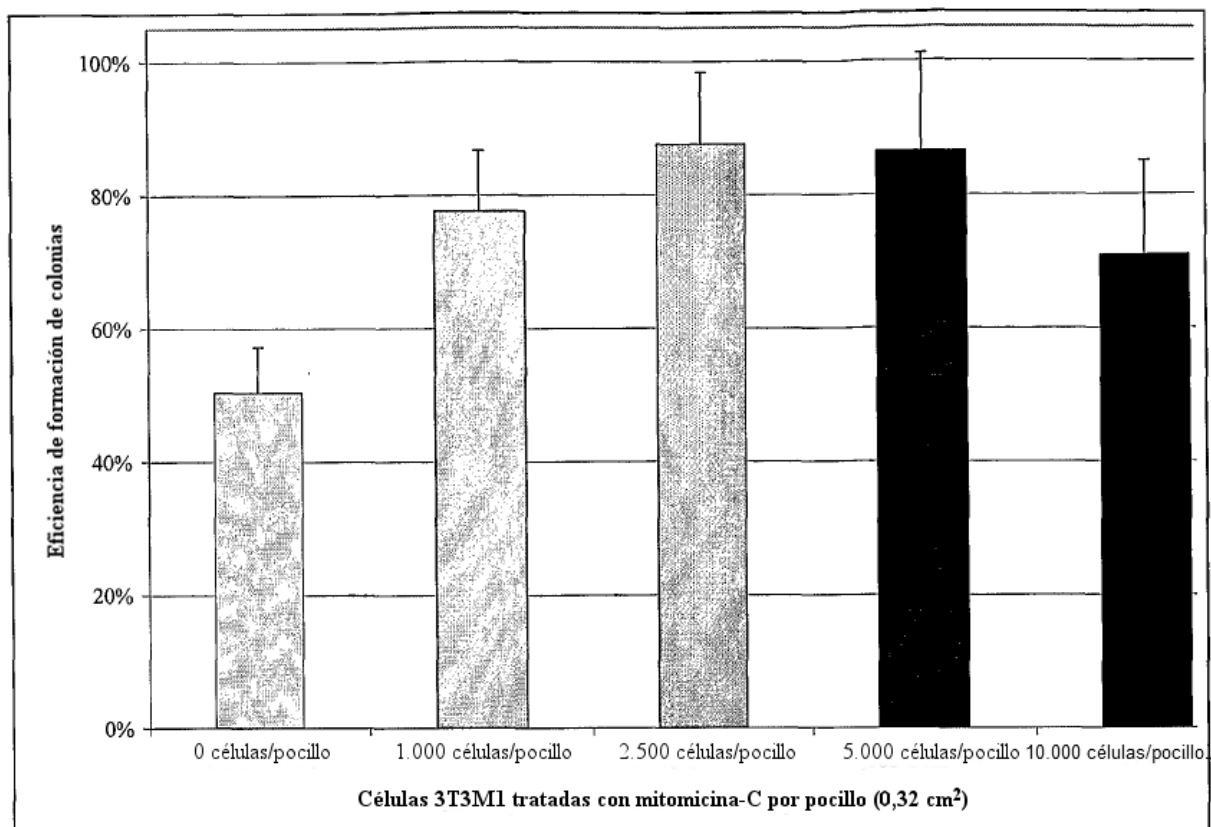
## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para proporcionar células recolectadas a partir de una capa alimentadora que comprende:
  - a) proporcionar: i) células de producto, en el que dichas células de producto se seleccionan entre un grupo que consiste en queratinocitos primarios y/o inmortalizados, ii) células de capa alimentadora, y iii) un agente que evita la replicación celular;
  - b) tratar dichas células de capa alimentadora con dicho agente que evita la replicación celular;
  - c) ensayar dichas células de capa alimentadora para la replicación con un ensayo de proliferación;
  - d) descartar dichas células de capa alimentadora que presentan una replicación celular;
  - e) cultivar dichas células de producto en dichas células de capa alimentadora;
  - f) separar dichas células de producto y dichas células de capa alimentadora, en el que las células de producto separadas están sustancialmente exentas de células de capa alimentadora residuales, en el que sustancialmente exentas de células de capa alimentadora residuales significa que las células de producto comprenden menos del 0,001 % de células de capa alimentadora en una base de célula de producto/célula de capa alimentadora;
  - g) ensayar dichas células de producto para la presencia de ADN de células de capa alimentadora;
  - h) descartar las células de producto que no están sustancialmente exentas de células de capa alimentadora residuales.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas células de producto son capaces de estratificarse en el epitelio escamoso.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos queratinocitos son células NIKS.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha capa alimentadora proporciona factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la capa alimentadora está formada por células de fibroblastos murinos.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que las células de fibroblastos murinos son células 3T3.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho agente es mitomicina-C.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha separación de dichas células de producto y dichas células de capa alimentadora se logra con EDTA.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ensayo de dichas células de capa alimentadora para una replicación se logra con un ensayo de proliferación.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dichas células de capa alimentadora están sustancialmente exentas de células de ratón replicadas.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ensayo de dichas células de producto con respecto a la presencia de ADN de células de capa alimentadora se logra con un ensayo por PCR de ADN de ratón.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se descartan dichas células de producto recolectadas de una capa alimentadora que contienen más de aproximadamente  $1,0 \times 10^4$  equivalentes de ADN de células de capa alimentadora.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas células de producto recolectadas de una capa alimentadora contienen menos de aproximadamente 0,015 % de equivalente de ADN de células alimentadoras en el interior de la población celular total.
14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas células de producto son células madre.
15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas células de producto se seleccionan entre un grupo que consiste en células de mamíferos.
16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se descartan dichas células de capa alimentadora que presentan una replicación celular.
17. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además incorporar dichas células de producto en un producto.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicho producto está sustancialmente exento de células de capa alimentadora residuales.
19. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además incorporar dichas células de producto en un equivalente de piel.

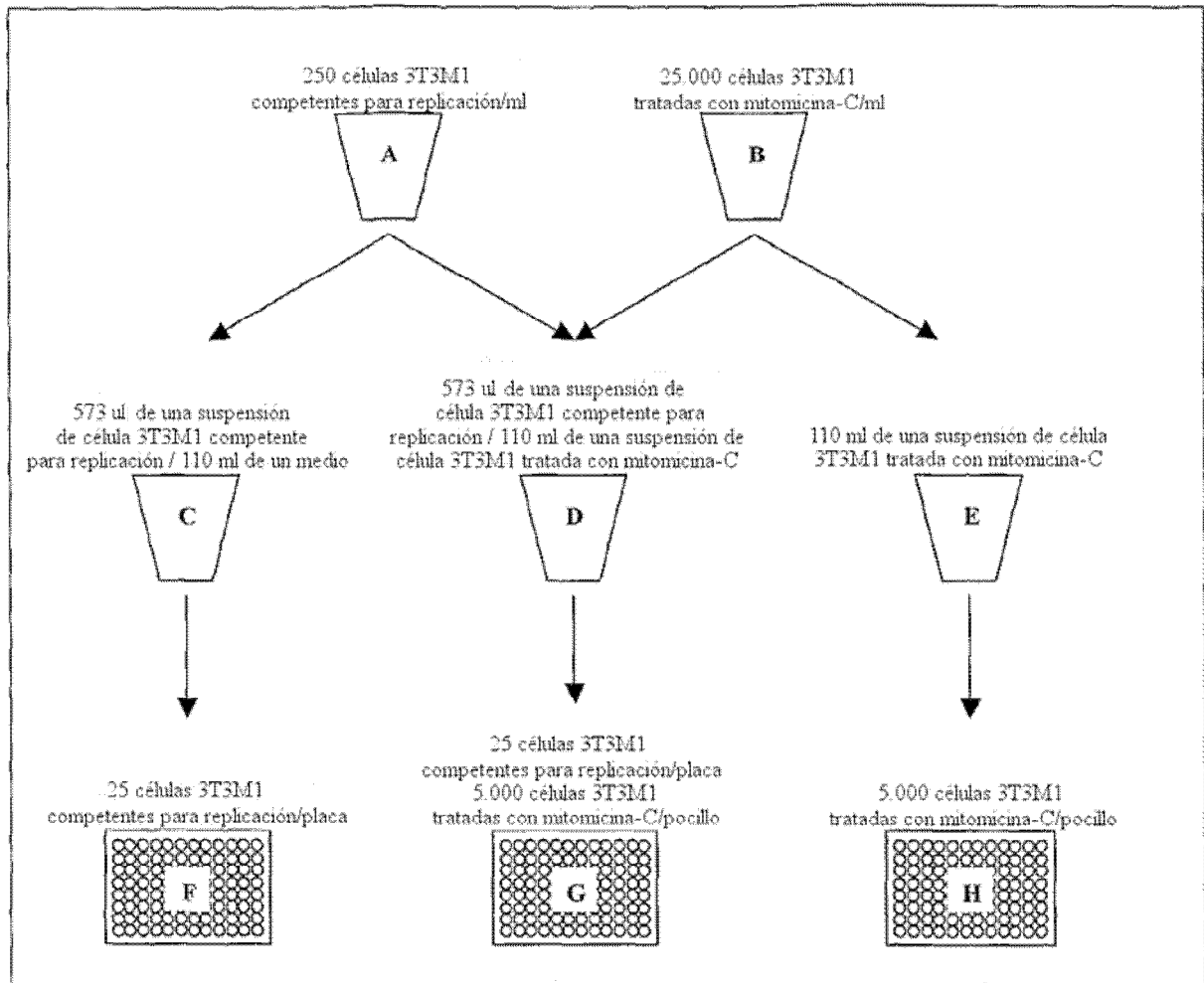
20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicho equivalente de piel está sustancialmente exento de células de capa alimentadora residuales.
- 5 21. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa que consiste en formar una composición equivalente de piel que comprende células de queratinocitos estratificados producidos por el procedimiento de la reivindicación 1.
22. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dichas células de queratinocitos son células NIKS.
23. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicha capa alimentadora está formada por células de fibroblastos murinos.
24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que dichas células de fibroblastos murinos son células 3T3.
- 10 25. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicha capa alimentadora se trata con mitomicina-C.
26. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicho equivalente de piel se separa de dicha capa alimentadora con EDTA.
27. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dicha capa alimentadora está sustancialmente exenta de células alimentadoras replicadas.
- 15 28. El procedimiento de la reivindicación 21, en el que dichos equivalentes de piel contienen menos del 0,015 % de equivalentes de ADN de células alimentadoras en el interior de la población celular total.



**Figura 1.**



**Figura 2.**



**Figura 3.**