

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 534**

51 Int. Cl.:

**C12M 3/00** (2006.01)

**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.11.2008 PCT/US2008/083585**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2009 WO09065005**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2008 E 08850430 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2215212**

54 Título: **Almacenamiento en frío de equivalentes de piel cultivados organotípicamente para aplicaciones clínicas**

30 Prioridad:

**14.11.2007 US 987911 P**

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

**12.01.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PIRNSTILL, JOHN y  
ALLEN-HOFFMANN, B. LYNN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 649 534 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

Almacenamiento en frío de equivalentes de piel cultivados organotípicamente para aplicaciones clínicas

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental con el número de subvención NIST 70NANB3H3011 concedido por el Programa de Tecnología Avanzada. El gobierno ostenta ciertos derechos sobre la invención.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere, en general, a sistemas y procedimientos para expedir y almacenar equivalentes de piel preparados mediante cultivo organotípico que se usarán para injertar piel a pacientes humanos.

**Antecedentes**

10 El campo emergente de la ingeniería tisular (TE) está listo para realizar enormes avances en el tratamiento de enfermedades y disfunciones de órganos en la próxima década. En 2001, fueron aprobados 23 agentes terapéuticos basados en células para comercialización en los Estados Unidos (EE. UU.) y Europa, de los cuales nueve fueron sustitutos de piel o injertos, y 100 productos más estaban en desarrollo. (De Bree, Genomics-based Drug Data Report and Regenerative Therapy (1)2: 77-96 (2001)). En 2007, casi 100 compañías estaban implicadas en el desarrollo de tejidos manipulados, agentes terapéuticos basados en células o tecnologías relacionadas (Applied Data Research, February 2007). En general, la industria presentaba una tasa de crecimiento anual del 16 % desde 1995 a 2001. El segmento de la industrial "estructural" (por ejemplo, piel, hueso, cartílago) mostró un 85 % de crecimiento desde 1998 a 2001. En 2004, el mercado estadounidense para reemplazos/sustitutos de piel de ingeniería tisular y moduladores de la reparación de heridas activos se valoró en aproximadamente 195 millones de dólares. Se espera que las ventas aumenten a una tasa anual compuesta del 9,5 %, alcanzando aproximadamente los 481 millones de dólares en el año 2014 (MedTech Insight, Windhover Information, septiembre de 2005). El mercado total estadounidense para tecnologías avanzadas de cicatrización de heridas estaba valorado en más de 2,3 miles de millones de dólares en 2005. A finales de 2006 el mercado alcanzará casi 2,6 mil millones de dólares, y durante un periodo de cinco años crecerá a una tasa de crecimiento anual promedio del 12,3 % hasta alcanzar 4,6 mil millones de dólares en 2011 (BCC Research, PHM011E, enero de 2007). Se estima que el mercado global de cicatrización de heridas valdrá 7,2 mil millones de dólares estadounidense en 2006 y comprende dos sectores, tradicional y avanzado (Espicom Business Intelligence, 2007). Los productos para cicatrización de heridas tradicionales consisten principalmente en apósitos a base de gasa de baja tecnología tales como esponjas tejidas y no tejidas, vendajes adaptativos y vendajes no adherentes. El segmento avanzado de la cicatrización de heridas (4,1 mil millones de dólares, global) es el área de crecimiento más rápido con un crecimiento de dos cifras del 10 % al año (Espicom Business Intelligence, 2007).

Aunque existen una multitud de aplicaciones revolucionarias y económicamente importantes para tejidos y órganos manipulados en el área de salud humana, el potencial económico completo de la industria está lejos de hacerse efectivo. Actualmente, solamente una de las compañías de ingeniería tisular con participación pública en el mundo ha mostrado beneficios a pesar de la inversión global en estas tecnologías que supera los 3,5 mil millones de dólares. (Lysaght y Reyes, Tissue Engineering 7(5): 485-93 (2001)).

Un impedimento fundamental para la aceptación de tejidos manipulados por facultativos médicos, profesionales sanitarios y segundos pagadores es la falta de un medio para preservar eficaz y eficientemente los tejidos manipulados. La naturaleza de los productos células y tejido vivo les hace imprácticos para almacenamiento a largo plazo. Los tejidos manipulados actuales deben almacenarse a menudo y expedirse en condiciones controladas cuidadosamente para mantener la viabilidad y la función. Normalmente, los productos de tejido manipulado tardan semanas o meses en producirse pero deben usarse en el plazo de horas o días después de la fabricación. Como resultado, las compañías de TE deben operar continuamente con sus instalaciones de producción a máxima capacidad y absorber los costes de pérdidas de inventario (es decir, producto no vendido que debe ser desechado). Estas pérdidas de inventario, además del ya costoso proceso de fabricación, han empujado los precios a niveles imprácticos. Como un ejemplo específico, APLIGRAF requiere a partir de cuatro semanas para fabricar, es utilizable durante menos de diez días y debe mantenerse entre 20 y 23 °C hasta usarlo. Como otro ejemplo, EPICEL es transportado por un enfermero desde Cambridge, MA hasta el punto de uso en una incubadora portátil y es usado nada más llegar. Dichas limitaciones representan desafíos significativos para el desarrollo de productos convenientes y rentables.

La criopreservación ha sido explorada como una solución al problema de almacenamiento, pero se sabe que induce daño tisular a través de la formación de hielo, lesión por congelación y equilibrio osmótico. Además de APLIGRAF, el único otro equivalente de piel vivo aprobado, ORCEL, está actualmente en ensayos clínicos como un producto congelado pero presenta la desventaja de que deba mantenerse a temperaturas por debajo de -100 °C antes del uso. Esto significa usar almacenamiento en nitrógeno líquido, que es caro, peligroso y no está disponible universalmente (por ejemplo clínicas rurales y hospitales de campo). Además, el suministro de un producto congelado requiere formación especial por parte del usuario final para descongelar con éxito el tejido antes del uso.

Por consiguiente, lo que se necesita en la técnica son procedimientos mejorados de preparación de tejidos y células manipulados para almacenamiento en condiciones que están disponibles de forma rutinaria en el punto de uso. Dado que todas las instalaciones clínicas tienen almacenamiento refrigerado, el desarrollo de un equivalente de piel que pueda almacenarse durante periodos prolongados en un frigorífico estándar mejoraría enormemente la disponibilidad y la utilidad clínica de estos productos.

Los sistemas de transporte para un equivalente de piel o productos basados en células y procedimientos de expedición y transporte de dichos equivalentes de piel o productos basados en células se han sugerido en la técnica anterior, véase por ejemplo WO 01/05942 A2, WO 93/08776 A1 y WO 2007/033051 A1. Sin embargo, dicha técnica anterior no describe el intervalo de temperatura en el que el equivalente de piel de la presente invención, es decir el equivalente de piel fabricado mediante cultivo organotípico que comprende capas dérmica y epidérmica, es expedido y almacenado tal como se define en las reivindicaciones.

### **Sumario de la invención**

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no están dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan para fines ilustrativos solamente y no forman parte de la presente invención. En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos de expedición de un equivalente de piel cultivado organotípicamente a un usuario y uso del equivalente de piel en un procedimiento de injerto de piel en un paciente humano que comprende: proporcionar el equivalente de piel cultivado organotípicamente que comprende capas dérmica y epidérmica y un embalaje estéril que comprende un soporte de gel; embalar el equivalente de piel en un embalaje estéril en condiciones estériles de modo que el equivalente de piel contacte con el soporte de gel; rebajar la temperatura del embalaje estéril a 2-8 grados Celsius; expedir el embalaje estéril a un usuario a 2-8 grados Celsius; almacenar el embalaje estéril en el sitio de uso a 2-8 grados Celsius en el que la esterilidad e integridad del embalaje estéril se mantienen; y retirar el equivalente de piel cultivado organotípicamente del embalaje y aplicarlo a un paciente sin una etapa de cultivo intermedia. La presente invención no está limitada a equivalentes de piel que comprenden cualesquiera tipos particulares de queratinocitos. En algunas realizaciones, el equivalente de piel cultivado organotípicamente comprende células NIKS. La presente invención no está limitada a ningún tipo particular de soporte de gel. En algunas realizaciones, el soporte de gel es un soporte de gel de agarosa. La presente invención no está limitada a ningún tipo particular de embalaje estéril. En algunas realizaciones, el embalaje estéril es termosellable. En realizaciones adicionales, el equivalente de piel contacta con el soporte de gel mediante una membrana permeable.

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos de expedición y almacenamiento de un equivalente de piel cultivado organotípicamente para uso en un procedimiento de injerto de piel que comprende: proporcionar el equivalente de piel cultivado organotípicamente que comprende capas dérmica y epidérmica y un embalaje estéril que comprende un soporte de gel; embalar el equivalente de piel en un embalaje estéril en condiciones estériles de modo que el equivalente de piel contacte con el soporte de gel en una fecha de embalaje; rebajar la temperatura del embalaje estéril a 2-8 grados Celsius; expedir el embalaje estéril a un usuario a 2-8 grados Celsius; almacenar el embalaje estéril en el sitio de uso a 2-8 grados Celsius en el que la esterilidad e integridad del embalaje estéril se mantienen durante de 8 a 15 días desde la fecha de embalaje. La presente invención no está limitada a equivalentes de piel que comprenden cualesquiera tipos particulares de queratinocitos. En algunas realizaciones, el equivalente de piel cultivado organotípicamente comprende células NIKS. La presente invención no está limitada a ningún tipo particular de soporte de gel. En algunas realizaciones, el soporte de gel es un soporte de gel de agarosa. La presente invención no está limitada a ningún tipo particular de embalaje estéril. En algunas realizaciones, el embalaje estéril es termosellable. En realizaciones adicionales, el equivalente de piel contacta con el soporte de gel mediante una membrana permeable.

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona procedimientos de expedición de un equivalente de piel cultivado organotípicamente a un usuario para uso en un procedimiento de injerto de piel que comprende: proporcionar el equivalente de piel cultivado organotípicamente que comprende capas dérmica y epidérmica y un embalaje estéril que comprende un soporte de gel, en el que el soporte de gel está formado con un medio mínimo; embalar el equivalente de piel en un embalaje estéril en condiciones estériles de modo que el equivalente de piel contacte con el soporte de gel; rebajar la temperatura del embalaje estéril a 2-8 grados Celsius; expedir el embalaje estéril a un usuario a 2-8 grados Celsius; almacenar el embalaje estéril en el sitio de uso 2-8 grados Celsius en el que la esterilidad e integridad del embalaje estéril se mantienen. La presente invención no está limitada a equivalentes de piel que comprenden cualesquiera tipos particulares de queratinocitos. En algunas realizaciones, el equivalente de piel cultivado organotípicamente comprende células NIKS. La presente invención no está limitada a ningún tipo particular de soporte de gel. En algunas realizaciones, el soporte de gel es un soporte de gel de agarosa. La presente invención no está limitada a ningún tipo particular de embalaje estéril. En algunas realizaciones, el embalaje estéril es termosellable. En realizaciones adicionales, el equivalente de piel contacta con el soporte de gel mediante una membrana permeable.

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona kits que comprenden: una cámara de expedición que comprende un soporte de gel que comprende un medio mínimo; un equivalente de piel soportado sobre una membrana permeable en contacto con el soporte de gel; en el que la cámara de expedición está contenida dentro de una bolsita estéril. La presente descripción no está limitada a equivalentes de piel que comprenden cualesquiera

tipos particulares de queratinocitos. En algunas realizaciones, el equivalente de piel cultivado organotípicamente comprende células NIKS. La presente invención no está limitada a ningún tipo particular de soporte de gel. En algunas realizaciones, el soporte de gel es un soporte de gel de agarosa. La presente invención no está limitada a ningún tipo particular de embalaje estéril. En algunas realizaciones, el embalaje estéril es termosellable. En realizaciones adicionales, el equivalente de piel contacta con el soporte de gel mediante una membrana permeable.

En algunos ejemplos, la presente descripción proporciona además artículos de fabricación que comprenden una cámara de expedición que comprende una parte superior de cámara y una parte inferior de cámara que tiene una superficie que tiene sobre ella un soporte de gel, comprendiendo además dicho artículo un equivalente de piel sobre una membrana permeable, dicha membrana permeable en contacto con dicho soporte de gel, comprendiendo además dicho artículo prolongaciones que se extienden desde dicha parte superior de cámara de modo que, cuando dicha parte superior de cámara se coloca sobre dicha parte inferior de cámara, dicho equivalente de piel se fija contra dicho soporte de gel. En algunos ejemplos, el soporte de gel está formado con medio mínimo.

### **Descripción de las figuras**

La figura 1 representa una cámara de expedición.  
 La figura 2 es un gráfico de datos de viabilidad.  
 La figura 3 es un gráfico de datos de viabilidad.  
 La figura 4 es un gráfico de datos de viabilidad.  
 La figura 5 es un gráfico de datos de viabilidad.  
 La figura 6 es un gráfico de datos de viabilidad.  
 La figura 7 es una tabla que presenta datos de viabilidad.  
 La figura 8 es una tabla que presenta datos resumidos de la función barrera.

### **DEFINICIONES**

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "equivalente de piel humana" y "sustituto de piel humana" se usan indistintamente para referirse a un cultivo derivado in vitro de queratinocitos que se ha estratificado en epitelio escamoso. Normalmente, los equivalentes de piel se producen mediante cultivo organotípico e incluyen una capa dérmica además de una capa de queratinocitos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "células NIKS<sup>®</sup>" se refiere a células que tienen las características de las células depositadas como la línea celular ATCC CRL-1219.

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

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, KGF-2). El polipéptido puede estar codificado 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 abarca 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 modo que el gen corresponda a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias que se ubican 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 5' no traducidas. Las secuencias que se ubican 3' o cadena abajo de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca 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 intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben a ARN nuclear (ARNnh); los intrones pueden contener elementos reguladores, tales como potenciadores. Los intrones se extraen o "se separan por empalme" del transcrito nuclear o primario; los intrones, por tanto, están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia u

ordenar los aminoácidos en un polipéptido naciente.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "codificación de molécula de ácido nucleico", "codificación de secuencia de ADN" y "codificación de ADN" se refieren al orden o la secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una cadena de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de aminoácidos a lo largo de la cadena del polipéptido (proteína). La secuencia de ADN codifica, de este modo, la secuencia de aminoácidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de ADN recombinante" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ADN que está compuesta por segmentos de ADN unidos entre sí por medio de técnicas de biología molecular.

Tal como se usa en el presente documento, el término "purificado" o "purificar" se refiere a la retirada de contaminantes de una muestra.

Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se usa 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 usa indistintamente con "vector."

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

"Unido de forma operativa" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos de este modo están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Una secuencia reguladora está "unida de forma operativa" a una secuencia codificante cuando está unida de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con la secuencia reguladora.

El término "transfección", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de ADN exógeno en células eucariotas. La transfección puede conseguirse mediante diversos 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 biobalística.

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. La expresión "transfectante estable" se refiere a una célula que ha integrado ADN exógeno de forma estable 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 gobiernan la expresión de genes endógenos en los cromosomas. La expresión "transfectante transitorio" se refiere a células que han captado ADN exógeno, pero no consiguen integrarse en este ADN.

### **Descripción detallada**

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no están dentro del alcance de dichas reivindicaciones se proporcionan para fines ilustrativos solamente y no forman parte de la presente invención. La presente invención se refiere, en general, a sistemas y procedimientos para expedir y almacenar equivalentes de piel fabricados mediante cultivo organotípico que se usarán para injerto de piel en pacientes humanos. En particular, la presente invención se refiere a procedimientos para la producción y el embalaje de un equivalente de piel estéril usando técnicas asépticas y manteniendo la esterilidad del equivalente de piel durante el almacenamiento durante hasta 15 días hasta que se abra en un campo quirúrgico estéril para uso clínico. Por comodidad, la descripción de la invención se presenta en las siguientes secciones:

#### **A) Equivalentes de piel producidos mediante cultivo organotípico**

La presente invención no está limitada al uso de ninguna fuente particular de células que son capaces de diferenciarse en epitelio escamoso. De hecho, la presente invención contempla el uso de diversas líneas celulares y fuentes que puedan diferenciarse en epitelio escamoso, incluyendo queratinocitos tanto primarios como inmortalizados. Fuentes de células incluyen queratinocitos y fibroblastos dérmicos extraídos por biopsia de seres humanos y donantes cadáver (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 de neonatos (Asbill y col., *Pharm. Research* 17(9): 1092-97 (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 líneas celulares

de queratinocito inmortalizadas 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<sup>®</sup> (Línea celular BC-1-Ep/SL; patente de Estados Unidos N.º 5.989.837; ATCC CRL-12191). Cada una de estas líneas celulares puede cultivarse o modificarse genéticamente con el fin de producir una línea celular capaz de expresar o coexpresar la proteína o proteínas deseadas. En realizaciones particularmente preferidas, se utilizan células NIKS<sup>®</sup>. El descubrimiento de una línea celular de queratinocitos humanos novedosa (queratinocitos inmortalizados casi diploides o NIKS<sup>®</sup>) ofrece una oportunidad para desarrollar por ingeniería genética queratinocitos humanos. Una ventaja única de las células NIKS<sup>®</sup> es que son una fuente constante de queratinocitos humanos genéticamente uniformes, libres de patógenos. Por esta razón, 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. La línea celular de queratinocitos NIKS<sup>®</sup>, identificada y caracterizada en la Universidad de Wisconsin, es no tumorigena, muestra un cariotipo estable, y muestra una diferenciación normal tanto en cultivo monocapa como organotípico. Las células NIKS<sup>®</sup> forman equivalentes de piel totalmente estratificados en cultivo. Estos cultivos son indistinguibles mediante todos los criterios ensayados hasta el momento de cultivos organotípicos formados por queratinocitos humanos primarios. A diferencia de las células primarias, las células NIKS<sup>®</sup> inmortalizadas continuarán, sin embargo, proliferando 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)). Los sustitutos de piel cultivados que resultan de modificaciones genéticas de queratinocitos usando células NIKS se conocen del documento US 2002/168768 A1.

Las células NIKS<sup>®</sup> surgieron de la cepa BC-1-Ep de los queratinocitos de prepucio neonatal humano aislados de un lactante varón aparentemente normal. En los primeros pases, las células BC-1-Ep no mostraron características morfológicas o de crecimiento que fueran atípicas para queratinocitos humanos normales cultivados. Las células BC1-Ep cultivadas mostraron estratificación, así como características de muerte celular programada. Para determinar la vida de replicación, las células BC-1-Ep se cultivaron sucesivamente 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 mostraban células grandes y planas. No obstante, en el pase 16, los queratinocitos que mostraban 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 supuesta parecía morfológicamente uniforme y produjo colonias de queratinocitos que muestran características típicas de queratinocitos, incluyendo la adhesión célula-célula y la producción de escamas evidentes. Los queratinocitos que sobrevivieron a la senescencia se cultivaron de forma sucesiva 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<sup>®</sup>. La línea celular NIKS<sup>®</sup> ha sido cribada para la presencia de secuencias de ADN proviral para VIH-1, VIH-2, VEB, CMV, VLCTH-1, VLCTH-2, VHB, VHC, parvovirus B-19, VPH-16 y VPH-31 al usar 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<sup>®</sup> contenían 47 cromosomas con un isocromosoma extra del brazo largo del cromosoma 8. No se detectaron otras anomalías cromosómicas groseras o cromosomas marcadores. En el pase 54, todas las células contenían el isocromosoma 8.

Las huellas genéticas de ADN para la línea celular NIKS<sup>®</sup> y los queratinocitos BC-1-Ep son idénticas en todos los doce loci analizados, lo que demuestra que las células NIKS<sup>®</sup> surgieron de la población de BC-1-Ep parental. Las probabilidades de que la línea celular NIKS<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> ofrecen una manera inequívoca para identificar la línea celular NIKS<sup>®</sup>.

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<sup>®</sup> es idéntica a las secuencias publicadas de p53 (número de referencia de 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> es idéntica a las células progenitoras BC-1-Ep. También se descubrió que Rb era de tipo silvestre en las células NIKS<sup>®</sup>.

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<sup>®</sup> en un medio que contenía 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.

Para determinar la tumorigenicidad de los queratinocitos de BC-1-EP parentales y la línea celular de queratinocitos inmortales NIKS®, se inyectaron las células en los flancos de ratones desnudos atímicos. La línea celular de carcinoma de células escamosas humanas, SCC4, se usó 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 inyección eliminó la variación entre animales en la producción tumoral y confirmó que los ratones soportarían el crecimiento vigoroso de células tumorigenas. 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 superficial como en cultivo organotípico. En los ejemplos se describen en detalle técnicas para cultivo organotípico. En realizaciones particularmente preferidas, los equivalentes de piel cultivados organotípicamente de la presente invención comprenden un equivalente dérmico formado a partir de colágeno o un material similar y fibroblastos. Los queratinocitos, por ejemplo células NIKS® o una combinación de células NIKS® y se siembran células de un paciente sobre el equivalente dérmico y forman una capa epidérmica caracterizada por diferenciación escamosa siguiendo el proceso de cultivo organotípico.

Para las células en el cultivo superficial, se controló un marcador de diferenciación 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 línea celular NIKS® producen envolturas córneas. Este hallazgo es coherente con estudios previos que demuestran que los queratinocitos subconfluentes de crecimiento activo producen menos del 5 % de envolturas córneas. Para determinar si la línea celular NIKS® es capaz de producir envolturas córneas cuando se le induce que se diferencie, las células se extrajeron del cultivo superficial 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 la adhesión de queratinocitos célula-célula y célula-sustrato. Los queratinocitos NIKS® produjeron tantas envolturas córneas como, y por lo general, más que los queratinocitos parentales. Estos descubrimientos demuestran que los queratinocitos NIKS® no son defectuosos en su capacidad para 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 desarrollados en sustratos de plástico y sumergidos en un medio se replican, pero muestran una diferenciación limitada. Específicamente, los queratinocitos humanos se vuelven confluentes y se someten a una estratificación limitada que produce una lámina que consiste en 3 o más capas de queratinocitos. 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 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 las 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 de diferenciación normal resultan evidentes. En las células parentales y la línea 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 son indicativas 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 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 tanto de las células parentales como de 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 la fecha, no se han observado diferencias histológicas en la diferenciación a nivel de microscopio óptico entre los queratinocitos parentales y la línea celular de queratinocitos NIKS® 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 línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados, NIKS®, se recogieron después de 15 días en cultivo organotípico y se seccionaron perpendicularmente a la capa basal para mostrar el grado de estratificación. Las células parentales y la línea 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 línea 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 línea 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<sup>®</sup> se han unido directamente al soporte poroso. Estos descubrimientos son coherentes con los descubrimientos ultraestructurales previos que usan queratinocitos de prepucio humano cultivados sobre un soporte poroso que contiene fibroblastos. El análisis a nivel de microscopía óptica y electrónica demuestra que la línea celular NIKS<sup>®</sup> 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) Expedición, almacenamiento y uso en el sitio**

En algunos ejemplos preferidos, la presente descripción proporciona procedimiento, kits y dispositivos para expedir y almacenar un equivalente de piel cultivado organotípicamente a un usuario para uso en un procedimiento de injerto de piel. La presente invención no está limitada a ningún procedimiento particular de producción de equivalentes de piel humana cultivados organotípicamente. De hecho, pueden usarse diversos procedimientos. En realizaciones preferidas, los equivalentes de piel cultivados organotípicamente de la presente invención se producen mediante los procedimientos descritos anteriormente y en los ejemplos, o modificaciones de los mismos.

Los sistemas de expedición y almacenamiento anteriores han dependido del uso de medios complejos y la necesidad de revivir el equivalente de piel en condiciones de cultivo óptimas antes del uso. Por ejemplo, equivalentes de piel EpiDerm<sup>™</sup>, que carecen de un equivalente dérmico, son expedidos a 2-8 °C en un medio gelificado que comprende EGF, insulina, hidrocortisona y otros factores patentados. Una vez que los equivalentes de piel llegan al sitio de uso, se ha notificado que el almacenamiento adicional requiere sumergir los equivalentes de piel con un medio líquido óptimo tal como HypoThermasoITM y cultivar a 37 °C para revivir los equivalentes de piel antes del uso. Véase, por ejemplo, Cook y col., Tissue Engineering 1(4): 361-77 (1995). Otros estudios demuestran que el almacenamiento a temperatura ambiente es óptimo. Robb y col., J. Burn Care Rehab. 22(6): 393-396 (2001). Dichos sistemas requieren desembalaje y cultivo de los equivalentes de piel o injertos cadavéricos en medios líquidos antes del uso, lo que no es práctico para uso clínico donde la esterilidad del tejido embalado debe mantenerse.

En algunos ejemplos de la presente descripción, los equivalentes de piel cultivados organotípicamente son embalados asépticamente en el sitio de fabricación para expedición a un sitio de uso. La fecha en que esto se produce es la "fecha de embalaje". En ejemplos preferidos, los equivalentes de piel cultivados organotípicamente se sellan en un embalaje estéril en condiciones estériles. En ejemplos preferidos, los equivalentes de piel cultivados organotípicamente se colocan en contacto con un soporte de gel. La presente invención no está limitada a ningún soporte de gel particular. En algunas realizaciones preferidas, el soporte de gel es agarosa. En realizaciones preferidas, el soporte de gel se produce con o comprende un medio mínimo. Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han descubierto que equivalentes de piel cultivados organotípicamente pueden estar soportados durante periodos de tiempo prolongados sobre soportes de gel suplementados con medios mínimos en oposición a medios complejos que comprenden agentes biológicos activos tales como factores de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, insulina y factor de crecimiento similar a insulina 1) y esteroides (por ejemplo, hidrocortisona). Los medios mínimos son medios que están sustancialmente libres de factores de crecimiento biológicamente activos y hormonas. Por sustancialmente libre se entiende, por ejemplo, que el medio comprende menos de aproximadamente 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 500 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml o 0,1 ng/ml o un factor de crecimiento (por ejemplo, EGF, IGF-1 o insulina) o esteroide (por ejemplo, hidrocortisona). En algunas realizaciones preferidas, el medio mínimo es una mezcla de DMEM y F12 y está libre de suero.

En algunos ejemplos preferidos, el soporte de gel se forma o se coloca en una cámara de expedición. Una cámara de expedición se ilustra en la figura 1. Con referencia a la figura 1, la cámara de expedición 100 está construida preferentemente a partir de una placa de cultivo tisular p150 con un diámetro de aproximadamente 150 mm y una altura de aproximadamente 20 mm. La cámara de expedición preferentemente comprende una parte superior 110 de cámara y una parte inferior 115 de cámara. La parte inferior 115 de cámara preferentemente comprende una pared lateral 120 de cámara y una superficie 125 de la parte inferior de cámara. En ejemplos preferidos, un soporte de gel 130 se forma sobre la superficie de la parte inferior de cámara. En algunos ejemplos preferidos, la cámara de expedición comprende un inserto 135 que comprende una membrana permeable 140 y prolongaciones 142 de inserto. En ejemplos preferidos, el equivalente de piel 145 se forma sobre la membrana permeable 140. En algunos ejemplos preferidos, la membrana permeable 140 del inserto 135 se coloca en contacto con el soporte de gel 130. En algunos ejemplos preferidos, la altura del soporte de gel 130 dentro de la cámara de expedición 100 es tal que, cuando el inserto 135 se coloca en la cámara de expedición 100 sobre el soporte de gel 130, las prolongaciones 142 de inserto se prolongan hacia arriba y contactan con la parte superior 110 de cámara cuando la parte superior 110 de cámara se coloca sobre la parte inferior 115 de cámara de modo que el inserto 135 se fije sobre el soporte de gel 130 mediante la fuerza descendente ejercida por la parte superior 110 de cámara y las prolongaciones 142 de inserto.

En algunos ejemplos preferidos, la temperatura del embalaje estéril se reduce a aproximadamente 2-8 grados C.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han descubierto que equivalentes de piel cultivados organotípicamente pueden expedirse y almacenarse a temperaturas reducidas y mantener su viabilidad para uso en procedimientos de injerto de piel y cierre de heridas. La capacidad de expedir y almacenar a temperaturas reducidas aumenta enormemente la flexibilidad de fabricación, expedición y uso de equivalentes de piel cultivados organotípicamente. Esto supone un contraste directo con la fabricación, expedición y uso de otros equivalentes de piel cultivados organotípicamente tales como APLIGRAF® que es utilizable durante menos de diez días y debe mantenerse entre 20 y 23 °C hasta que se use. Usando los procedimientos y kit de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones, equivalentes de piel cultivados organotípicamente pueden usarse preferentemente hasta 15 días después de la fecha de embalaje. El tiempo de almacenamiento adicional potencia enormemente la flexibilidad de uso de los equivalentes de piel cultivados organotípicamente.

En ejemplos preferidos, el embalaje estéril se coloca en un recipiente aislado y se envasa con compresas frías, preferentemente compresas frías de gel, para mantener la temperatura del embalaje estéril a 2-8 grados C durante la expedición. Tras la llegada al sitio de uso, tal como en un hospital, clínica de atención de emergencia, unidad médica militar u otra clínica de atención sanitaria, el embalaje estéril se retira del recipiente aislado y se coloca en una unidad de refrigeración para almacenamiento a 2-8 °C hasta el momento del uso. En algunos ejemplos preferidos, la integridad (y esterilidad) del embalaje estéril se mantiene hasta inmediatamente antes del uso por un facultativo u otro profesional sanitario, por ejemplo, en un quirófano. En ejemplos preferidos, una etapa de cultivo intermedia o periodo de revivificación no se requiere antes del uso del equivalente de piel cultivado organotípicamente en un procedimiento de injerto de piel o cierre de heridas. Esta característica representa una mejora sustancial e inesperada respecto a procedimientos anteriores donde el tejido debe almacenarse a una temperatura superior o revivirse a una temperatura más alta en un medio líquido para uso.

### C) Usos terapéuticos

Se contempla que las células, órganos y tejidos conservados de la presente descripción pueden usarse terapéuticamente.

En algunos ejemplos, las células órganos y tejidos se utilizan para tratar heridas crónicas de la piel. El tratamiento con éxito de heridas crónicas de la piel (por ejemplo, úlceras venosas, úlceras diabéticas, úlceras de presión) es un grave problema. La cicatrización de dicha herida a menudo tarda mucho más de un año de tratamiento. Las opciones de tratamientos actualmente incluyen apósitos y desbridamiento (uso de productos químicos o cirugía para retirar el tejido necrótico), y/o antibióticos en el caso de infección. Estas opciones de tratamiento requieren periodos de tiempo prolongados y cantidades elevadas de cumplimiento terapéutico por parte del paciente. Por lo tanto, una terapia que pueda aumentar el éxito de un facultativo en la cicatrización de heridas crónicas y acelerar la velocidad de cicatrización de heridas satisfaría una necesidad insatisfecha en el campo. Por consiguiente, la presente descripción contempla tratamiento de heridas cutáneas con equivalentes de piel que comprenden las células de la presente descripción (por ejemplo, células NIKS®). En algunos ejemplos, las células NIKS® se aplican por vía tópica a sitios de herida. En otros ejemplos, equivalentes de piel que comprenden células NIKS® se usan para injerto sobre heridas de grosor parcial. En otros ejemplos, equivalentes de piel que comprenden células NIKS® se usan para injerto sobre heridas de grosor total. En otros ejemplos, equivalentes de piel que comprenden células NIKS® se usan para tratar numerosos tipos de heridas internas, incluyendo, aunque sin limitarse a, heridas internas de las membranas mucosas que revisten el tracto gastrointestinal, colitis ulcerosa en inflamación de membranas mucosas que puede ser causada por terapias oncológicas. En aún otros ejemplos, equivalentes de piel que comprenden células NIKS® que expresan, se usan como un aparato temporal o permanente.

Equivalentes de piel que comprenden células también se usan en aplicaciones de cierre de heridas y tratamiento de quemaduras. El uso de autoinjertos y aloinjertos para el tratamiento de quemaduras y el 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 pueden usarse junto con reemplazos dérmicos tales como DERMAGRAFT o INTEGRA. En otros ejemplos, los equivalentes de piel se producen usando tanto una fuente estándar 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 aún ejemplos adicionales, el equivalente de piel contiene queratinocitos de un aislado de tejido humano. Por consiguiente, 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 padece una herida y tratar al paciente con el equivalente de piel en condiciones tales que la herida se cierre.

En aún ejemplos adicionales, las células se manipulan para proporcionar agentes terapéuticos adicionales a un sujeto. La presente descripción no está limitada a la administración de ningún agente terapéutico particular. De hecho, se contempla que diversos agentes terapéuticos pueden suministrarse al sujeto, incluyendo, aunque sin limitarse a, enzimas, péptidos, hormonas peptídicas, otras proteínas, ARN ribosómico, ribozimas y ARN antisentido. Estos agentes terapéuticos pueden administrarse para diversos fines, incluyendo aunque sin limitarse al fin de corregir defectos genéticos. En algunos ejemplos preferidos particulares, el agente terapéutico se administra con el fin de desintoxicar a un paciente con un error congénito heredado del metabolismo (por ejemplo, aminoacidopatías) en el que el injerto sirve como tejido de tipo silvestre. Se contempla que la administración del agente terapéutico corrige el defecto. En algunos ejemplos, las células son transformadas con una construcción de ADN que codifica un

agente terapéutico (por ejemplo, insulina, factor de coagulación IX, eritropoyetina, etc.) y las células injertadas sobre el sujeto. El agente terapéutico se administra a continuación al torrente sanguíneo u otros tejidos del paciente a partir del injerto. En ejemplos preferidos, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico está unido de forma operativa a un promotor adecuado. La presente descripción no está limitada al uso de ningún promotor particular. De hecho, se contempla el uso de diversos promotores, incluyendo, aunque sin limitarse a, 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, mediante coprecipitación con fosfato cálcico o mediante transfección por liposomas). En otros ejemplos preferidos, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se proporciona como un vector y el vector se introduce en los queratinocitos mediante procedimientos conocidos en la técnica. En algunos ejemplos, el vector es un vector episómico tal como un plásmido. En otros ejemplos, el vector se integra en el genoma de los queratinocitos. Los ejemplos de vectores de integración incluyen, aunque sin limitarse a, vectores retrovirales, vectores de virus adenoasociado y vectores de transposón.

### Parte experimental

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertos aspectos preferidos de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

En la divulgación experimental siguiente, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar);  $\mu\text{M}$  (micromolar); N (Normal); mol (moles); mmol (milimoles);  $\mu\text{mol}$  (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos);  $\mu\text{g}$  (microgramos); ng (nanogramos); l (litros); ml (mililitros);  $\mu\text{l}$  (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros);  $\mu\text{m}$  (micrómetros); nm (nanómetros);  $^{\circ}\text{C}$  (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); BSA (albúmina de suero bovino).

### Ejemplo 1

Este ejemplo describe un procedimiento para la producción de equivalentes de piel.

**Medios.** El proceso de cultivo organotípico usa seis medios de cultivo diferentes: medio de células alimentadoras 3T3 (TM); medio de crecimiento de fibroblastos humanos (FGM); medio NIKS<sup>®</sup> (NM); medio de siembra en placas (PM); medio de estratificación A (SMA); y medio de estratificación B (SMB). Se usa TM para propagar células 3T3 que actúan como células alimentadoras para células NIKS<sup>®</sup> en cultivo monocapa. TM es una mezcla de medio Eagle modificado por Dulbecco (DME, GibcoBRL) complementada con suero de ternera al 10% (Hyclone). FGM es un medio de cultivo de fibroblastos disponible en el mercado (Clonetics) que se usa para propagar las células de fibroblastos dérmicos normales humanas (NHDF) para uso en las capas de equivalente dérmico del equivalente de piel STRATAGRAFT<sup>®</sup> y el equivalente de piel STATATEST. Se usa NM para desarrollar queratinocitos de NIKS<sup>®</sup>. NM es una mezcla 3:1 de medio F-12 de Ham (GibcoBRL) y DME suplementado con Clon Fetal II al 2,5% (Hyclone), 0,4 mg/ml de hidrocortisona (Calbiochem), 8,4 ng/ml de toxina de cólera (ICN), 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de insulina (GibcoBRL), 24  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de adenina (Sigma) y 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF, R&D systems). PM es el medio utilizando cuando se siembran células NIKS<sup>®</sup> sobre un equivalente dérmico. PM es el mismo que NM excepto que se retira EGF, el suero se reduce al 0,2% y se suplementa con  $\text{CaCl}_2$  (Sigma) hasta una concentración final de calcio de 1,88 mM. SMA es el mismo que PM con la adición de 1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 1  $\mu\text{M}$  de isoproterenol, 10  $\mu\text{M}$  de carnitina, 10  $\mu\text{M}$  de serina, 25  $\mu\text{M}$  de ácido oleico, 15  $\mu\text{M}$  de ácido linoleico, 7  $\mu\text{M}$  de ácido araquidónico, 1  $\mu\text{M}$  de  $\alpha$ -tocoferol, 0,05 mg/ml de ácido ascórbico (todos de Sigma), y 1 ng/ml de EGF. SMB se usa durante la fase de estratificación epidérmica del crecimiento del equivalente de piel STRATATEST y el equivalente de piel STRATAGRAFT<sup>®</sup>. SMB es el mismo que SMA, pero sin la presencia del suplemento de suero de Clon Fetal II.

**Preparación de alimentadoras.** Antes del inicio de los cultivos organotípicos del equivalente de piel STRATAGRAFT<sup>®</sup>, se preparan células alimentadoras 3T3 y, a continuación, se usan frescas o congeladas para el uso posterior. Las células 3T3 se cultivan hasta la confluencia y se tratan con mitomicina-C (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en TM, Roche) durante cuatro horas. A continuación, las células se lavan, se resuspenden y se siembran en placas a una densidad de  $1,25 \times 10^6$  por placa de cultivo tisular de 100 mm para apoyar el crecimiento de NIKS<sup>®</sup>. Si se usan alimentadoras congeladas, se descongela una única ampolla congelada que contiene 1 ml con  $2 \times 10^6$ , se diluye con TM fresco y se siembra sobre una o más placas de cultivo tisular de 100 mm. Esto se realiza para tantas placas como sea necesario para el crecimiento de células NIKS<sup>®</sup> un día antes de sembrar en placas las células NIKS<sup>®</sup>.

**Preparación del equivalente dérmico.** El día 0, se descongelan y siembran en placas células NHDF congeladas. Las células se alimentan con FGM-2 el día siguiente (día 1) para el crioprotector residual y de nuevo el día 3. El día 4, se recogen para usar en el equivalente dérmico. Para preparar el equivalente dérmico, se diluye primero el colágeno de cola de rata (Tipo I, Becton-Dickinson) hasta 3 mg/ml en ácido acético 0,03 N y se enfría en hielo. Se mezcla una mezcla de medio F12 de Ham concentrado (8,7X fuerza normal y tamponado con HEPES a pH 7,5) con Clon Fetal II (suero bovino suplementado). Estas dos soluciones son el 11,5 y el 10 % del volumen de solución final. Se añade NaOH 1 N a la mezcla del medio (2,5 % de la solución final). El colágeno diluido (74 %) se añade a continuación a la mezcla. A la mezcla se le añade un 2 % en volumen de fibroblastos suspendidos ( $1,3 \times 10^6$  células/ml para el equivalente dérmico de STRATAGRAFT<sup>®</sup>). Para cultivos de STATATEST, se coge una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  en los insertos de cultivo tisular (MILLICELL de Millipore Corp.) y se colocan en una placa de cultivo tisular

de 100 mm. Después de 30 minutos para la formación de gel, la placa se baña con 20 ml de FGM-2. Se colocan una o dos gotas de la mezcla de suero F-12 en la superficie de cada equivalente dérmico. El equivalente de piel STRATAGRAFT® usa insertos TRANSWELL de Corning. Un equivalente dérmico de 13 ml se vierte en cada inserto. Después del periodo de formación de gel de 30 minutos, 80 ml de FGM-2 se colocan alrededor del inserto

- 5 TRANSWELL en una placa de cultivo tisular de 150 mm y se colocan 10 ml encima del equivalente dérmico. Los insertos se colocan en una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, humedad relativa del 90 %, hasta su uso. En el momento que los equivalentes dérmicos se siembran con células NIKS®, se elevan hasta la interfase con aire mediante su colocación sobre una malla de acero inoxidable estéril para suministrar el medio a través de la parte inferior del inserto de cultivo tisular.
- 10 **Crecimiento y siembra de NIKS®.** El día 0, las alimentadoras se siembran en placas en NM. El día 1, las células NIKS® se siembran en placas sobre las alimentadoras a una densidad de aproximadamente  $3 \times 10^5$  células por placa de 100 mm. El día 2, las células NIKS® se alimentan con NM fresco para retirar el crioprotector residual. Las células NIKS® se alimentan de nuevo los días 4 y 6. (Para cultivos de tamaño de equivalente de piel STRATAGRAFT®, los cultivos de NIKS® se inician una semana antes debido al aumento del número de células necesarias). El día 8, las
- 15 células NIKS® se recogen, se cuentan y se resuspenden en PM.  $4,65 \times 10^5$  células NIKS®/cm<sup>2</sup> se siembran sobre la superficie de los insertos MILLICELL o TRANSWELL. Las placas se alimentan con 30 ml de PM (100 ml para equivalente de piel STRATAGRAFT®) debajo del elevador metálico y se colocan de vuelta en la incubadora. El día 10, los cultivos se alimentan con SMA. Los días 12, 14, 16, 18, 20 y 22 los cultivos se alimentan con SMB. El día 12, los cultivos se transfieren a una incubadora al 75 % de humedad donde permanecen durante el resto de su
- 20 desarrollo.

### Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que el almacenamiento de equivalentes de piel durante 1 día a 2-8 °C es superior al almacenamiento a 20-25 °C.

### Resumen:

- 25 El tejido de piel STRATAGRAFT® es un tejido sustituto de piel vivo que tiene una capa completamente estratificada de queratinocitos epidérmicos viables sobre un gel de colágeno que contiene fibroblastos dérmicos humanos normales. Las capas epidérmicas más superiores forman una barrera de permeabilidad que impide una pérdida excesiva de humedad a través de la epidermis. Ensayos que miden estas propiedades estructurales y funcionales clave (viabilidad, histología y función barrera) han sido identificados como ensayos indicadores de estabilidad para
- 30 monitorizar la calidad del tejido de piel STRATAGRAFT® a lo largo del tiempo.

- El proceso de producción para el tejido de piel STRATAGRAFT® dura 31 días. Al final del proceso de producción, los tejidos de piel STRATAGRAFT® se retiran de condiciones de cultivo organotípico y se colocan sobre cámaras de expedición con agarosa nutriente tamponadas con HEPES, que están diseñadas para mantener la viabilidad, la función barrera y la arquitectura histológica de tejidos de piel STRATAGRAFT® antes del uso clínico. Este estudio se
- 35 llevó a cabo para comparar propiedades de tejido de piel STRATAGRAFT® después del almacenamiento en cámaras de expedición durante 1 día a 2 - 8 °C o 20 - 25 °C. Dos lotes independientes de tejido de piel STRATAGRAFT® se analizaron para viabilidad, función barrera e histología después de un periodo de almacenamiento de 1 día a 2 - 8 °C o 20 - 25 °C. Los tejidos almacenados a ambas temperaturas presentaban función barrera e histología comparables. Sin embargo, el almacenamiento a 2 - 8 °C dio como resultado una mayor viabilidad que tejidos almacenados a 20 -
- 40 25 °C. Este estudio demostró que el almacenamiento de tejido de piel STRATAGRAFT® a 2 - 8 °C durante 1 día dio como resultado propiedades tisulares que eran similares a, o superiores a, las de tejidos almacenados a 20° - 25 °C.

### Diseño experimental:

- Dos lotes de STRATAGRAFT® independientes producidos según las actuales buenas prácticas de fabricación en la Waisman Clinical Biomanufacturing Facility (WCBF) se usaron para este estudio. Un tejido de cada lote se ensayó el
- 45 día 28 del proceso de producción STRATAGRAFT® mediante Control de Calidad de Stratatech según el procedimiento operativo estándar para viabilidad, función barrera e histología. Los seis tejidos restantes en cada lote se alimentaron el día del proceso 28 y el día del proceso 30. El día del proceso 31, los 6 tejidos se colocaron en cámaras de expedición y se almacenaron por triplicado a 2 - 8 °C o 20 - 25 °C durante día. Para permitir la estandarización de las condiciones de análisis tisular, los tejidos que se almacenaron a 2° - 8 °C se calentaron
- 50 durante 1 hora a 20 - 25 °C antes del análisis.

### Resultados:

#### Viabilidad:

- Los datos se presentan a continuación en las tablas 1 y 2 y en la figura 2. Todas las muestras de tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados durante 1 día a 20 - 25 °C y 2 - 8 °C cumplían los criterios de aceptación de viabilidad ( $A_{550} \geq 0,533$ ). La viabilidad de tejidos almacenados a 2 - 8 °C fue comparable con los tejidos de CC del
- 55 día 28 y fue mayor que la de tejidos almacenados a 20 - 25 °C.

ES 2 649 534 T3

Tabla 1. Resumen de viabilidad

	Tejido de CC del día 28	Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 20 - 25 °C	Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 2 - 8 °C
Tamaño de muestra	8	24	24
Media	0,880	0,746	0,855
Mínimo	0,699	0,630	0,699
Máximo	0,986	0,944	0,986
Recuento < 0,533	0	0	0
SD	0,104	0,074	0,072
% de viabilidad del día 28	100	85	97

Tabla 2. Valores individuales de viabilidad

<b>Tejido de CC del día 28</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 022 Tejido 6</b>	<b>Centro</b>	0,699
	<b>Borde</b>	0,985
	<b>Borde</b>	0,769
	<b>Borde</b>	0,882
<b>Lote 023 Tejido 7</b>	<b>Centro</b>	0,976
	<b>Borde</b>	0,849
	<b>Borde</b>	0,894
	<b>Borde</b>	0,986
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 20 - 25 °C</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 022 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	0,654
	<b>Borde</b>	0,803
	<b>Borde</b>	0,656
	<b>Borde</b>	0,687
<b>Lote 022 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	0,765
	<b>Borde</b>	0,944
	<b>Borde</b>	0,699
	<b>Borde</b>	0,778

ES 2 649 534 T3

(continuación)

<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 20 - 25 °C</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 022 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	0,756
	<b>Borde</b>	0,750
	<b>Borde</b>	0,839
	<b>Borde</b>	0,851
<b>Lote 023 Tejido 4</b>	<b>Centro</b>	0,690
	<b>Borde</b>	0,794
	<b>Borde</b>	0,673
	<b>Borde</b>	0,719
<b>Lote 023 Tejido 5</b>	<b>Centro</b>	0,630
	<b>Borde</b>	0,767
	<b>Borde</b>	0,782
	<b>Borde</b>	0,764
<b>Lote 023 Tejido 6</b>	<b>Centro</b>	0,695
	<b>Borde</b>	0,782
	<b>Borde</b>	0,657
	<b>Borde</b>	0,780
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 2 - 8 °C</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 022 Tejido 4</b>	<b>Centro</b>	0,699
	<b>Borde</b>	0,985
	<b>Borde</b>	0,769
	<b>Borde</b>	0,882
<b>Lote 022 Tejido 5</b>	<b>Centro</b>	0,976
	<b>Borde</b>	0,849
	<b>Borde</b>	0,894
	<b>Borde</b>	0,986
<b>Lote 022 Tejido 7</b>	<b>Centro</b>	0,832
	<b>Borde</b>	0,820
	<b>Borde</b>	0,890
	<b>Borde</b>	0,821

(continuación)

<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 2 - 8 °C</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 023 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	0,789
	<b>Borde</b>	0,852
	<b>Borde</b>	0,854
	<b>Borde</b>	0,859
<b>Lote 023 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	0,794
	<b>Borde</b>	0,731
	<b>Borde</b>	0,871
	<b>Borde</b>	0,858
<b>Lote 023 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	0,823
	<b>Borde</b>	0,922
	<b>Borde</b>	0,860
	<b>Borde</b>	0,909

Función barrera:

5 Los datos de función barrera se presentan a continuación en las tablas 3 y 4. Los criterios de aceptación para la función barrera son que todas las lecturas deben tener un valor de DPM inicial  $\leq 294$  y un cambio de DPM durante un intervalo de 10 segundos  $\leq 658$ .

10 Los tejidos de CC del día 28 y los tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados a 20 - 25 °C presentaban una función barrera aceptable. Una única lectura de un tejido de piel STRATAGRAFT® almacenado a 2 - 8 °C presentaba un valor de DPM inicial por encima de los criterios de aceptación (en negrita en la tabla 4). Se observó que está lectura fallida se había producido en una zona del tejido donde se había acumulado líquido. Por lo tanto, el líquido acumulado sobre la superficie del tejido es probablemente la causa del elevado valor inicial. Todas las demás lecturas de tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados a 2 - 8 °C superaron los criterios de aceptación y fueron comparables a lecturas de función barrera de tejidos almacenados a 20 - 25 °C. La función barrera mejoraba ligeramente después del almacenamiento a cualquier temperatura en comparación con los tejidos de CC del día 28.

15 Estos datos demostraron que la función barrera de tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados durante 1 día a 20 - 25 °C o 2 - 8 °C es comparable.

Tabla 3. Tabla resumen de función barrera

<b>Tejido de CC del día 28</b>		
<b>Lote</b>	<b>DPM inicial</b>	<b>Cambio de DPM</b>
<b>Lote 022 Tejido 6</b>	98	<b>122</b>
<b>Lote 023 Tejido 7</b>	101	<b>87</b>
<b>Dos lotes (2 tejidos)</b>	99	<b>104</b>
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 20 - 25 °C</b>		
<b>Lote</b>	<b>DPM inicial</b>	<b>Cambio de DPM</b>

(continuación)

<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 20 - 25 °C</b>		
<b>Lote 022 (3 tejidos)</b>	94	<b>31</b>
<b>Lote 023 (3 tejidos)</b>	96	<b>29</b>
<b>Dos lotes (6 tejidos)</b>	95	<b>30</b>
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 2-8 °C</b>		
<b>Lote</b>	<b>DPM inicial</b>	<b>Cambio de DPM</b>
<b>Lote 022 Tejido 6</b>	<b>134</b>	<b>79</b>
<b>Lote 023 Tejido 7</b>	<b>96</b>	<b>32</b>
<b>Dos lotes (2 tejidos)</b>	<b>115</b>	<b>56</b>

Tabla 4. Valores individuales de función barrera

<b>Tejido de CC del día 28</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>Lote 022 Tejido 6</b>	<b>Centro</b>	90	172
	<b>Borde</b>	106	106
	<b>Borde</b>	104	104
	<b>Borde</b>	90	106
<b>Lote 023 Tejido 7</b>	<b>Centro</b>	102	210
	<b>Borde</b>	102	70
	<b>Borde</b>	108	38
	<b>Borde</b>	92	28
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 20-25 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>Lote 022 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	100	20
	<b>Borde</b>	92	18
	<b>Borde</b>	100	44
	<b>Borde</b>	96	24

ES 2 649 534 T3

(continuación)

<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 20-25 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>Lote 022 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	92	40
	<b>Borde</b>	96	28
	<b>Borde</b>	92	24
	<b>Borde</b>	96	16
<b>Lote 022 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	90	42
	<b>Borde</b>	90	36
	<b>Borde</b>	96	32
	<b>Borde</b>	92	44
<b>Lote 023 Tejido 4</b>	<b>Centro</b>	98	28
	<b>Borde</b>	106	10
	<b>Borde</b>	90	24
	<b>Borde</b>	102	20
<b>Lote 023 Tejido 5</b>	<b>Centro</b>	94	28
	<b>Borde</b>	90	32
	<b>Borde</b>	102	32
	<b>Borde</b>	90	28
<b>Lote 023 Tejido 6</b>	<b>Centro</b>	102	16
	<b>Borde</b>	94	26
	<b>Borde</b>	90	68
	<b>Borde</b>	98	36
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 2 - 8 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>Lote 022 Tejido 4</b>	<b>Centro</b>	108	80
	<b>Borde</b>	496	272
	<b>Borde</b>	90	76
	<b>Borde</b>	94	64
<b>Lote 022 Tejido 5</b>	<b>Centro</b>	98	70
	<b>Borde</b>	110	40
	<b>Borde</b>	96	76
	<b>Borde</b>	90	40

(continuación)

<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 2 - 8 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>Lote 022 Tejido 7</b>	<b>Centro</b>	114	30
	<b>Borde</b>	108	38
	<b>Borde</b>	110	72
	<b>Borde</b>	94	92
<b>Lote 023 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	102	32
	<b>Borde</b>	90	40
	<b>Borde</b>	94	40
	<b>Borde</b>	102	34
<b>Lote 023 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	92	28
	<b>Borde</b>	90	32
	<b>Borde</b>	92	54
	<b>Borde</b>	98	24
<b>Lote 023 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	94	32
	<b>Borde</b>	96	30
	<b>Borde</b>	98	24
	<b>Borde</b>	102	14

**Histología:**

5 El aspecto típico de una sección de tejido STRATAGRAFT® embebida en parafina teñida con hematoxilina y eosina incluye fibroblastos en la capa dérmica, una capa basal de pequeños, queratinocitos nucleados en la unión entre las capas epidérmica y dérmica, múltiples capas de queratinocitos en diferenciación por encima de la capa basal, y una capa de corneocitos aplanados. Todos los tejidos estaban conformes a las especificaciones para histología. Los tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados a 2 - 8 °C presentaban una arquitectura tisular comparable a tejidos almacenados a 20 - 25 °C y ambos conjuntos de tejidos almacenados fueron comparables a los tejidos de CC del día 10 28.

**Conclusiones:**

15 El almacenamiento a 2 - 8 °C durante 1 día dio como resultado tejidos de piel STRATAGRAFT® con mayor viabilidad que el almacenamiento a 20 - 25 °C. La función barrera y la histología de tejidos almacenados durante 1 día a 2 - 8 °C y 20 - 25 °C fueron comparables. Estos resultados demuestran que 1 día de almacenamiento a temperatura reducida a 2° - 8 °C no afecta de forma adversa a las propiedades del tejido de piel STRATAGRAFT® en comparación con tejidos almacenados a 20° - 25 °C.

**Ejemplo 3**

20 Este ejemplo demuestra que equivalentes de piel almacenados durante 8 días a 2-8 °C son comparables a, o superiores a, tejidos almacenados durante solamente 1 día a 20-25 °C. Se ha demostrado que la reducción de la temperatura de almacenamiento mantiene una calidad del tejido comparable con tejidos almacenados a 20 - 25 °C (véase el ejemplo 2). La capacidad para almacenar tejido STRATAGRAFT® durante ocho días a 2 - 8 °C aumentaría el número de días que el tejido STRATAGRAFT® está disponible para uso clínico. Este estudio ensayó la comparabilidad de tejidos almacenados durante un día a 20 - 25 °C con tejidos almacenados a 2 - 8 °C durante ocho días. La viabilidad del tejido mejoró en los tejidos que se almacenaron a 2 - 8 °C, incluso aunque estos tejidos se 25 almacenaron durante siete días adicionales.

**Diseño experimental:**

5 Este estudio usó un lote de tejidos fabricados según las actuales buenas prácticas de fabricación en la WCBF y dos lotes producidos en la planta piloto de producción de Stratatech. Un tejido de cada lote se analizó el día del proceso 28. Los seis tejidos restantes se alimentaron el día 28 y 30, y se colocaron en cámaras de expedición el día del proceso 31. Tres tejidos de cada lote se almacenaron a 20 - 25 °C durante 1 día antes del análisis. Los tres tejidos restantes de cada lote se almacenaron a 2 - 8 °C durante 8 días. Antes del análisis, los tejidos almacenados durante 8 días a 2 - 8 °C se equilibraron a 20 - 25 °C durante una hora.

**Resultados:**

Viabilidad del tejido:

10 Los datos de viabilidad se presentan en la tabla 5 y la figura 3. Todas las muestras de viabilidad cumplían los criterios de aceptación ( $A_{550} \geq 0,533$ ). Sin embargo, en las tres comparaciones intra-lote (figura 3 panel izquierdo), la viabilidad de tejidos almacenados a 2 - 8 °C durante 8 días fue mayor que la de tejidos almacenados durante un día a 20 - 25 °C. El valor medio de  $A_{550}$  para los tejidos almacenados a 20 - 25 °C durante 1 día fue de 0,709, en comparación con 0,831 para tejidos almacenados a 2 - 8 °C durante ocho días. Estos datos indican que el  
15 almacenamiento de tejidos STRATAGRAFT® a 2 - 8 °C es capaz mejor de mantener la viabilidad del tejido que el almacenamiento a 20 - 25 °C.

Tabla 5. Resumen de datos de viabilidad del tejido

	Día 28	Almacenamiento 1d @	Almacenamiento 8d @
	Tejido de CC	20 - 25 °C	2 - 8 °C
Tamaño de muestra	12	36	36
Media	0,822	0,709	0,831
Mínimo	0,628	0,558	0,542
Máximo	0,976	0,807	0,970
SD	0,130	0,060	0,095

20 Función barrera:

Los tejidos se analizaron con un medidor de impedancia Nova. Los datos se presentan en las tablas 6 y 7. Toda las lecturas cumplían los criterios de liberación de lote para tejido STRATAGRAFT® (Lectura inicial  $\leq 294$ , Cambio  $\leq 658$ ). Estos datos sugieren que el almacenamiento de tejido STRATAGRAFT® durante ocho días a 2 - 8 °C no afecta de forma adversa a la función barrera del tejido, en comparación con tejidos analizados después del almacenamiento a 20 - 25 °C durante 1 día.  
25

Tabla 6. Datos de función barrera

Tejido de CC del día 28			
Tejido	Ubicación	DPM	
		Inicial	Cambio
SG-082806-21 Día 28	Centro	104	520
	Borde	194	448
	Borde	102	428
	Borde	108	416

(continuación)

<b>Tejido de CC del día 28</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>QC039-082806 Día 28</b>	<b>Centro</b>	120	480
	<b>Borde</b>	150	438
	<b>Borde</b>	90	488
	<b>Borde</b>	102	360
<b>STR-SG-SGM-021 Día 28</b>	<b>Centro</b>	96	78
	<b>Borde</b>	96	112
	<b>Borde</b>	96	76
	<b>Borde</b>	96	50
<b>Almacenamiento 1d a 20 - 25 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>SG-082806-21 Día 32 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	106	302
	<b>Borde</b>	104	298
	<b>Borde</b>	106	342
	<b>Borde</b>	128	268
<b>SG-082806-21 Día 32 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	102	332
	<b>Borde</b>	96	382
	<b>Borde</b>	102	334
	<b>Borde</b>	138	364
<b>SG-082806-21 Día 32 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	114	380
	<b>Borde</b>	114	360
	<b>Borde</b>	114	362
	<b>Borde</b>	104	374
<b>QC039-082806 Día 32 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	112	232
	<b>Borde</b>	130	206
	<b>Borde</b>	94	298
	<b>Borde</b>	114	198
<b>QC039-082806 Día 32 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	108	198
	<b>Borde</b>	116	230
	<b>Borde</b>	90	254
	<b>Borde</b>	90	254

ES 2 649 534 T3

(continuación)

<b>Almacenamiento 1d a 20 - 25 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>QC039-082806 Día 32 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	116	182
	<b>Borde</b>	130	276
	<b>Borde</b>	94	210
	<b>Borde</b>	126	160
<b>STR-SG-SGM-021 Día 32 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	98	60
	<b>Borde</b>	114	60
	<b>Borde</b>	98	90
	<b>Borde</b>	96	70
<b>STR-SG-SGM-021 Día 32 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	92	40
	<b>Borde</b>	98	32
	<b>Borde</b>	98	70
	<b>Borde</b>	114	38
<b>STR-SG-SGM-021 Día 32 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	94	56
	<b>Borde</b>	94	58
	<b>Borde</b>	106	68
	<b>Borde</b>	90	106
<b>Almacenamiento 8d a 2 - 8 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>SG-082806-21 Día 39 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	106	428
	<b>Borde</b>	132	414
	<b>Borde</b>	112	414
	<b>Borde</b>	122	422
<b>SG-082806-21 Día 39 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	114	332
	<b>Borde</b>	106	442
	<b>Borde</b>	96	446
	<b>Borde</b>	112	274
<b>SG-082806-21 Día 39 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	112	386
	<b>Borde</b>	110	520
	<b>Borde</b>	112	394
	<b>Borde</b>	122	488

(continuación)

<b>Almacenamiento 8d a 2 - 8 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>QC039-082806 Día 39 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	100	268
	<b>Borde</b>	114	302
	<b>Borde</b>	106	378
	<b>Borde</b>	106	294
<b>QC039-082806 Día 39 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	116	318
	<b>Borde</b>	94	320
	<b>Borde</b>	110	300
	<b>Borde</b>	128	272
<b>QC039-082806 Día 39 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	96	290
	<b>Borde</b>	112	234
	<b>Borde</b>	118	300
	<b>Borde</b>	122	311
<b>STR-SG-SGM-021 Día 39 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	102	112
	<b>Borde</b>	90	122
	<b>Borde</b>	90	48
	<b>Borde</b>	90	40
<b>STR-SG-SGM-021 Día 39 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	114	80
	<b>Borde</b>	124	94
	<b>Borde</b>	90	58
	<b>Borde</b>	90	76
<b>STR-SG-SGM-021 Día 39 Tejido 3 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	114	66
	<b>Borde</b>	90	40
	<b>Borde</b>	94	62
	<b>Borde</b>	90	44

Tabla 7. Tabla resumen de función barrera

Tejidos a día 28			Almacenamiento 1 d a 20-25 °C			Almacenamiento 8 d a 2-8 °C		
Lote	DPM inicial	Cambio de DPM	Lote	DPM inicial	Cambio de DPM	Lote	DPM inicial	Cambio de DPM
SG022806-21 Día 28 (1 tejido)	127	453	SG022806-21 Día 32 (3 tejidos)	111	342	SG022806-21 Día 39 (3 tejidos)	113	413
QC039-082806 Día 28 (1 tejido)	116	442	QC039-082806 Día 32 (3 tejidos)	110	225	QC039-082806 Día 39 (3 tejidos)	110	299
STR-SG-SGM-021 Día 28 (1 tejido)	96	79	STR-SG-SGM-021 Día 32 (3 tejidos)	99	62	STR-SG-SGM-021 Día 39 (3 tejidos)	98	70
Tres lotes Día 28 (3 tejidos)	113	325	Tres lotes Día 32 (9 tejidos)	107	210	Tres lotes Día 39 (9 tejidos)	107	261

Histología:

La histología de los tres conjuntos de tejido almacenados durante 8 días a 2 - 8 °C cumplía los criterios de aceptación para tejido STRATAGRAFT®. En contraste, dos de los tres lotes de STRATAGRAFT® almacenados durante día a 20 - 25 °C presentaban una histología atípica con numerosos huecos intercelulares. Estos datos sugieren que el almacenamiento de tejido STRATAGRAFT® durante ocho días a 2 - 8 °C no afecta de forma adversa a la histología del tejido, en comparación con tejidos almacenados durante 1 día a 20 - 25 °C.

Conclusiones:

En este estudio, tejido STRATAGRAFT® almacenado durante ocho días a 2 - 8 °C presentaba propiedades de viabilidad, histología y función barrera comparables con o mejores que tejidos almacenados durante 1 día a 20 - 25 °C. Este resultado demuestra que hasta ocho de almacenamiento a 2 - 8 °C no afecta de forma adversa a las propiedades del tejido STRATAGRAFT®.

**Ejemplo 4**

Prolongar la duración que tejidos de piel STRATAGRAFT® pueden almacenarse en cámaras de expedición hasta 15 días es altamente deseable dado que potenciaría la disponibilidad de tejido STRATAGRAFT® para uso clínico. Este ejemplo demuestra que el almacenamiento de equivalentes de piel en cámaras de expedición con agarosa nutriente durante más de 8 días es sub-óptimo a temperaturas por encima de 2 - 8 °C.

Diseño experimental:

Los tejidos STRATAGRAFT® producidos en el laboratorio de desarrollo de procesos de Stratatech se embalaron en cámaras de expedición con agarosa nutriente el día 28 del proceso de producción y se almacenaron a aproximadamente 2 - 8 °C, 15 °C o 22,5 °C durante 1, 4, 8, 15 o 29 días. Los tejidos se analizaron para viabilidad e histología después de los periodos de almacenamiento indicados. No se realizaron mediciones de función barrera en todos los tejidos, y por tanto estos datos no se presentan.

Resultados:

Los datos de viabilidad de este estudio se muestran en la figura 4. Todas las temperaturas de almacenamiento fueron equivalentes en su capacidad para mantener la viabilidad del tejido durante hasta 4 días de almacenamiento. Después de 8 días de almacenamiento, los resultados de viabilidad de tejidos almacenados a 2-8 °C o 15 °C fueron comparables entre sí y fueron superiores a los de tejidos almacenados a 20-25 °C. Después de 15 o 29 días de almacenamiento, los tejidos almacenados a 2-8 °C mostraron mayor viabilidad en comparación con tejidos almacenados a 15 °C o 20-25 °C.

Conclusiones:

Este estudio demuestra que el almacenamiento de equivalentes de piel a 2-8 °C es más robusto que el almacenamiento a temperaturas por encima de 15 °C en la capacidad de soportar la viabilidad del tejido más allá de 8 días de almacenamiento.

**Ejemplo 5**

5 Prolongar la duración que los tejidos de piel STRATAGRAFT® pueden almacenarse en cámaras de expedición hasta 15 días es altamente deseable dado que potenciaría la disponibilidad de tejido STRATAGRAFT® para uso clínico. Este estudio se llevó a cabo para ensayar la viabilidad de almacenar tejido de piel STRATAGRAFT® a 2 - 8 °C durante 15 días en cámaras de expedición que contienen agarosa nutriente sin suplementar.

**Diseño experimental:**

10 Tejidos de tres lotes independientes de tejido de piel STRATAGRAFT® producidos en la WCBF se usaron para este estudio. Un tejido seleccionado aleatoriamente de cada lote se ensayó el día 28 del proceso de producción del tejido de piel STRATAGRAFT®. Los seis tejidos restantes en cada lote se alimentaron con medio SMB el día del proceso 28 y el día del proceso 30. El día del proceso 31, los 6 tejidos se colocaron en cámaras de expedición y se almacenaron a 2 - 8 °C durante 1, 8 o 15 días. Después del intervalo de almacenamiento especificado, los tejidos se incubaron a 20 - 25 °C durante 1 hora y a continuación se analizaron para viabilidad, función barrera e histología.

**Resultados:**

Viabilidad:

15 Los datos de viabilidad se presentan en las tablas 8 y 9 y en la figura 4. El criterio de aceptación es que todas las muestras tienen un  $A_{550} \geq 0,533$ . Todos los tejidos de CC del día 28 y tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados a 2 - 8 °C durante 1, 8 y 15 días in este estudio cumplían la criterios de aceptación de viabilidad.

Tabla 8. Resumen de viabilidad

	Tejido de CC del día 28	Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 2 - 8 °C	Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 8d a 2 - 8 °C	Tejido de piel StrataGraft™ Storage 15d a 2 - 8 °C
Tamaño de muestra	12	12	24	36
Media (Lote 025)	0,757	0,829	NA	0,628
Media (Lote 027)	0,963	NA	0,734	0,686
Media (Lote 028)	0,779	NA	0,778	0,690
Mínimo	0,716	0,742	0,659	0,563
Máximo	1,019	0,901	0,865	0,851
Recuento < 0,533	0	0	0	0
SD (por muestra)	0,110	0,051	0,057	0,061
% de Tejido de CC Día 28 respectivo	100 %	108 - 111 % (promedio 110 %)	74 - 103 % (promedio 88 %)	67 - 92 % (promedio 81 %)

20

Tabla 9. Valores individuales de viabilidad

<b>Tejido de CC del día 28</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 025 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	0,730
	<b>Borde</b>	0,788
	<b>Borde</b>	0,739
	<b>Borde</b>	0,769
<b>Lote 027 Tejido 4</b>	<b>Centro</b>	0,832
	<b>Borde</b>	1,000
	<b>Borde</b>	1,019
	<b>Borde</b>	1,000
<b>Lote 028 Tejido 6</b>	<b>Centro</b>	0,716
	<b>Borde</b>	0,785
	<b>Borde</b>	0,818
	<b>Borde</b>	0,796
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 2 - 8 °C</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 025 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	0,749
	<b>Borde</b>	0,880
	<b>Borde</b>	0,843
	<b>Borde</b>	0,901
<b>Lote 025 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	0,834
	<b>Borde</b>	0,789
	<b>Borde</b>	0,835
	<b>Borde</b>	0,824
<b>Lote 025 Tejido 4</b>	<b>Centro</b>	0,813
	<b>Borde</b>	0,836
	<b>Borde</b>	0,901
	<b>Borde</b>	0,742
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 8d a 2 - 8 °C</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 027 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	0,751
	<b>Borde</b>	0,717
	<b>Borde</b>	0,687
	<b>Borde</b>	0,700

ES 2 649 534 T3

(continuación)

<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 8d a 2 - 8 °C</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 027 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	0,723
	<b>Borde</b>	0,792
	<b>Borde</b>	0,778
	<b>Borde</b>	0,757
<b>Lote 027 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	0,741
	<b>Borde</b>	0,715
	<b>Borde</b>	0,670
	<b>Borde</b>	0,781
<b>Lote 028 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	0,734
	<b>Borde</b>	0,742
	<b>Borde</b>	0,865
	<b>Borde</b>	0,856
<b>Lote 028 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	0,769
	<b>Borde</b>	0,771
	<b>Borde</b>	0,786
	<b>Borde</b>	0,838
<b>Lote 028 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	0,758
	<b>Borde</b>	0,659
	<b>Borde</b>	0,701
	<b>Borde</b>	0,856
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Storage 15d a 2 - 8 °C</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 025 Tejido 5</b>	<b>Centro</b>	0,624
	<b>Borde</b>	0,563
	<b>Borde</b>	0,623
	<b>Borde</b>	0,585
<b>Lote 025 Tejido 6</b>	<b>Centro</b>	0,592
	<b>Borde</b>	0,685
	<b>Borde</b>	0,648
	<b>Borde</b>	0,610

(continuación)

<b>Tejido de piel StrataGraft™ Storage 15d a 2 - 8 °C</b>		
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>A550</b>
<b>Lote 025 Tejido 7</b>	<b>Centro</b>	0,607
	<b>Borde</b>	0,636
	<b>Borde</b>	0,635
	<b>Borde</b>	0,729
<b>Lote 027 Tejido 5</b>	<b>Centro</b>	0,622
	<b>Borde</b>	0,668
	<b>Borde</b>	0,729
	<b>Borde</b>	0,712
<b>Lote 027 Tejido 6</b>	<b>Centro</b>	0,602
	<b>Borde</b>	0,712
	<b>Borde</b>	0,734
	<b>Borde</b>	0,851
<b>Lote 027 Tejido 7</b>	<b>Centro</b>	0,621
	<b>Borde</b>	0,712
	<b>Borde</b>	0,653
	<b>Borde</b>	0,613
<b>Lote 028 Tejido 4</b>	<b>Centro</b>	0,660
	<b>Borde</b>	0,707
	<b>Borde</b>	0,686
	<b>Borde</b>	0,702
<b>Lote 028 Tejido 5</b>	<b>Centro</b>	0,692
	<b>Borde</b>	0,665
	<b>Borde</b>	0,571
	<b>Borde</b>	0,737
<b>Lote 028 Tejido 7</b>	<b>Centro</b>	0,699
	<b>Borde</b>	0,738
	<b>Borde</b>	0,733
	<b>Borde</b>	0,685

Función barrera:

5 Los datos de función barrera se presentan a continuación en las tablas 10 y 11 y en la figura 5. Los criterios de aceptación para función barrera son que todas las lecturas deben tener un valor de DPM inicial  $\leq 294$  y un cambio de DPM durante un intervalo de 10 segundos  $\leq 658$ .

Todos los tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados a 2 - 8 °C durante 1 día y 8 días cumplían los criterios de aceptación para función barrera. Hubo una única lectura (sombreado gris en la tabla 11) de un tejido almacenado a 2

5 - 8 °C durante 15 días que mostró un valor inicial de DPM inaceptablemente alto. Todas las demás lecturas de tejidos almacenados durante 15 días cumplían los criterios de aceptación. Este elevado valor inicial de DPM podría haber sido causado por una acumulación de condensación sobre la superficie del tejido durante el almacenamiento, lo que se ve comúnmente en tejidos almacenados a 2 - 8 °C. Con la excepción de esta lectura elevada individual, la función barrera de todos los tejidos almacenados fue comparable con los tejidos de CC del día 28. Estos datos demostraron que aumentar la duración de almacenamiento a 2 - 8 °C no afecta de forma adversa a la función barrera del tejido.

Tabla 10. Tabla resumen de función barrera

Tejido del día 28			Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1 d a 2 - 8 °C			Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 8 d a 2 - 8 °C			Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 15 d a 2 - 8 °C		
Lote	DPM inicial	Cambio de DPM	Lote	DPM inicial	Cambio de DPM	Lote	DPM inicial	Cambio de DPM	Lote	DPM inicial	Cambio de DPM
Lote 025	113	130	Lote 025 (3 tejidos)	108	96	Lote 027 (3 tejidos)	98	70	Lote 025 (3 tejidos)	100	87
Tejido del lote 027	96	99				Lote 028 (3 tejidos)	108	216	Lote 027 (3 tejidos)	165	181
Tejido del lote 028	102	113							Lote 028 (3 tejidos)	108	72
Tres lotes (3 tejidos)	104	114	Un lote (3 tejidos)	108	96	Dos lotes (6 tejidos)	103	143	Tres lotes (9 tejidos)	124	113

Tabla 11. Valores individuales de función barrera

Tejido de CC del día 28			
		DPM	
Tejido	Ubicación	Inicial	Cambio
Lote 025 Tejido 1	Centro	90	36
	Borde	102	102
	Borde	92	88
	Borde	168	294
Lote 027 Tejido 4	Centro	90	134
	Borde	100	112
	Borde	94	72
	Borde	98	78
Lote 028 Tejido	Centro	112	92
	Borde	92	92
	Borde	104	78
	Borde	100	188

ES 2 649 534 T3

(continuación)

<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 1d a 2 - 8 °C</b>			
		<b>DPM</b>	
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>Lote 025 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	94	68
	<b>Borde</b>	98	60
	<b>Borde</b>	124	156
	<b>Borde</b>	102	44
<b>Lote 025 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	98	52
	<b>Borde</b>	114	110
	<b>Borde</b>	122	70
	<b>Borde</b>	108	92
<b>Lote 025 Tejido 4</b>	<b>Centro</b>	100	46
	<b>Borde</b>	106	196
	<b>Borde</b>	106	136
	<b>Borde</b>	122	124
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 8d a 2 - 8 °C</b>			
		<b>DPM</b>	
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>Lote 027 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	94	64
	<b>Borde</b>	90	44
	<b>Borde</b>	90	74
	<b>Borde</b>	94	64
<b>Lote 027 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	98	68
	<b>Borde</b>	108	46
	<b>Borde</b>	114	80
	<b>Borde</b>	90	36
<b>Lote 027 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	90	50
	<b>Borde</b>	106	178
	<b>Borde</b>	98	84
	<b>Borde</b>	98	52

ES 2 649 534 T3

(continuación)

<b>Tejido de piel StrataGraft™ Almacenamiento 8d a 2 - 8 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>Lote 028 Tejido 1</b>	<b>Centro</b>	94	194
	<b>Borde</b>	150	280
	<b>Borde</b>	140	328
	<b>Borde</b>	96	272
<b>Lote 028 Tejido 2</b>	<b>Centro</b>	102	76
	<b>Borde</b>	132	234
	<b>Borde</b>	94	130
	<b>Borde</b>	94	196
<b>Lote 028 Tejido 3</b>	<b>Centro</b>	94	90
	<b>Borde</b>	100	182
	<b>Borde</b>	90	178
	<b>Borde</b>	108	434
<b>Tejido de piel StrataGraft™ Storage 15d a 2 - 8 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>Lote 025 Tejido 5</b>	<b>Centro</b>	94	44
	<b>Borde</b>	112	38
	<b>Borde</b>	92	66
	<b>Borde</b>	98	56
<b>Lote 025 Tejido 6</b>	<b>Centro</b>	102	76
	<b>Borde</b>	104	60
	<b>Borde</b>	112	172
	<b>Borde</b>	96	198
<b>Lote 025 Tejido 7</b>	<b>Centro</b>	90	64
	<b>Borde</b>	96	104
	<b>Borde</b>	94	82
	<b>Borde</b>	112	88
<b>Lote 027 Tejido 5</b>	<b>Centro</b>	94	138
	<b>Borde</b>	100	218
	<b>Borde</b>	110	126
	<b>Borde</b>	124	144

(continuación)

<b>Tejido de piel StrataGraft™ Storage 15d a 2 - 8 °C</b>			
<b>Tejido</b>	<b>Ubicación</b>	<b>DPM</b>	
		<b>Inicial</b>	<b>Cambio</b>
<b>Lote 027 Tejido 6</b>	<b>Centro</b>	98	114
	<b>Borde</b>	280	308
	<b>Borde</b>	94	150
	<b>Borde</b>	92	140
<b>Lote 027 Tejido 7</b>	<b>Centro</b>	96	184
	<b>Borde</b>	<b>642</b>	118
	<b>Borde</b>	106	246
	<b>Borde</b>	142	280
<b>Lote 028 Tejido 4</b>	<b>Centro</b>	110	62
	<b>Borde</b>	104	112
	<b>Borde</b>	106	70
	<b>Borde</b>	92	48
<b>Lote 028 Tejido 5</b>	<b>Centro</b>	90	68
	<b>Borde</b>	98	68
	<b>Borde</b>	226	146
	<b>Borde</b>	98	70
<b>Lote 028 Tejido 7</b>	<b>Centro</b>	90	58
	<b>Borde</b>	94	38
	<b>Borde</b>	102	44
	<b>Borde</b>	90	74

Histología:

En general, tejidos almacenados a 2 - 8 °C durante 15 días mostraron una arquitectura histológica típica, que consiste en una dermis que contiene fibroblastos y una epidermis que contiene todas las capas de tejido requeridas.

5 **Conclusiones:**

Los resultados de este estudio demuestran que tejido STRATAGRAFT® almacenados a 2 - 8 °C durante hasta 15 días cumple los criterios de liberación de lote para tejido STRATAGRAFT®. En general, la función barrera no resultaba afectada de forma adversa por el aumento de la duración de almacenamiento a 15 días. La viabilidad de tejidos almacenados a 2 - 8 °C durante 15 días cumplía los criterios de aceptación para tejido STRATAGRAFT®. Los tejidos almacenados durante 15 días también cumplían los criterios de aceptación para histología.

**Ejemplo 6**

Este ejemplo describe cómo se fabrican las cámaras de expedición y los embalajes estériles para expedición.

Se prepara una solución de agarosa al 3 % mezclando 45 g de agarosa en 1455 ml de agua. La mezcla se agita y a continuación se autoclava (121 °C durante 60 min.) hasta disolver la agarosa. Se prepara una solución de medios 2X mezclando en 1455 ml de agua: 24 g de polvo de medio F12, 10,0 g de polvo de medio DMEM y 7,2 g de polvo de HEPES. La mezcla se agita hasta que todo el polvo se disuelve y el pH se ajusta de 7,3 a 7,5. La solución de medios 2X y la solución de agarosa al 3 % se colocan en baños de agua a 40 °C durante 30-60 minutos. La solución de

medios 2X se filtra a continuación de forma estéril y se añade asepticamente a la solución de agarosa al 3 % a través de un filtro Sterivex™. 60 ml de la solución resultante se dispensa a continuación asepticamente a una placa de cultivo p150 estéril (placa de cultivo tisular circular de 150 mm X 20 mm) y se les permitió gelificar. Si no se usan inmediatamente, las cámaras de expedición se envasan en una bolsa estéril termosellable para almacenamiento hasta el uso. Para expedición, un equivalente de piel en un inserto Transwell (7,5 cm de diámetro (44 cm<sup>2</sup>), tamaño de poro 0,4 micrómetros) se coloca asepticamente sobre la agarosa en la cámara de expedición y la parte superior de la placa p150 se coloca sobre la cámara de expedición y se fija en condiciones asépticas. La cámara de expedición se coloca a continuación en una bolsita termosellable estéril y se sella para proporcionar un embalaje de expedición. El embalaje de expedición se almacena y se expide a 2-8 °C, y es almacenable en el sitio de uso a 2-8 °C durante 8-15 días desde el momento de embalaje hasta inmediatamente antes del tiempo de uso. La integridad del embalaje puede mantenerse hasta el momento de uso y la revivificación del equivalente de piel antes del uso no es necesaria.

### Ejemplo 7

Este ejemplo describe un procedimiento simplificado para la producción de equivalentes de piel. **Medios.** El proceso de cultivo organotípico usa tres medios de cultivo diferentes, todos basados en la formulación de medio SMB descrito en la patente de Estados Unidos 7.407.805, con la excepción de que la toxina del cólera se omite de todos los medios. FM01 se usa para propagar los fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) para uso en capas equivalentes dérmicas de equivalente de piel. FM01 tiene la misma formulación que SMB excepto que contiene suero de clon Fetal II (2 % final) y carece de toxina del cólera. KM01 se usa para cultivar queratinocitos NIKS® y tiene la misma composición que SMB excepto que contiene clon fetal II al 2,5 %, y se añade factor de crecimiento epidérmico (EGF) adicional a una concentración final de 5 ng/ml. Se usa SM01 durante la fase de estratificación epidérmica de producción de equivalente de piel y es idéntica a SMB excepto por la omisión de la toxina del cólera.

**Preparación de equivalente dérmico.** El día 0, células NHDF congeladas se descongelan y se siembran en placas. Las células son alimentadas con FM01 al día siguiente (día 1) para retirar el crioprotector residual y de nuevo el día 3. El día 4, se recogen para uso en el equivalente dérmico. Para preparar el equivalente dérmico, colágeno de cola de rata de tipo I se diluye en primer lugar a 3 mg/ml en ácido acético 0,03 N y se enfría en hielo. Una mezcla de medio F12 de Ham concentrado (8,7X fuerza normal y tamponado con HEPES a pH 7,5) se mezcla con clon fetal II. Estas dos soluciones son el 11,3 y el 9,6 % del volumen final de solución. Se añade NaOH 1 N a la mezcla de medio (2,4 % de la solución final). El colágeno diluido se añade a continuación (74,7 %) a la mezcla. Se añade un volumen del 2 % de fibroblastos suspendidos (2,78 X 10<sup>6</sup>/ml) a la mezcla. Se vierten 9 ml de la mezcla final de equivalente dérmico en cada inserto TRANSWELL de 75 mm (Corning Costar). Después de un periodo de formación de gel de 50-70 minutos, los insertos Transwell se transfieren a la superficie de una malla de acero inoxidable en una placa de cultivo de 150 mm. Se colocan 80 ml de FM01 en la placa de 150 mm fuera del inserto TRANSWELL y se colocan 10 ml encima del equivalente dérmico. Los equivalentes dérmicos se colocan en una incubadora a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %, 90 % de humedad relativa durante 4-5 días antes del uso en los cultivos organotípicos.

**Cultivo y siembra de NIKS®.** Se siembran y se colocan en placas células NIKS® a una densidad de aproximadamente 5 x 10<sup>5</sup> células por placa de 100 mm. El cultivo de NIKS® puede realizarse en presencia o ausencia de células alimentadoras de ratón. El día 1, las células NIKS® son alimentadas con KM01 fresco para retirar el crioprotector residual. Las células NIKS® son alimentadas de nuevo el día 3. El día 4, las células NIKS® se recogen de los cultivos de p100 iniciales y se siembran en matraces de cultivo de 225 cm<sup>2</sup> a una densidad de 1,2 x 10<sup>6</sup> por matraz. Los cultivos de NIKS® son alimentados con medio fresco los días 7 y 8. El día 9, las células NIKS® se recogen, se cuentan y se resuspenden en SM01. 2,27 X 10<sup>4</sup> células NIKS®/cm<sup>2</sup> se siembran sobre la superficie de los equivalentes dérmicos. Las placas de los cultivos son alimentadas y se elevan hasta la interfase aire-medio. Los cultivos se transfieren a una incubadora con humedad controlada ajustada al 75 % donde permanecen durante el resto de su desarrollo. Los cultivos son alimentados con SM01 los días 14, 18, 22, 25, 28 y 30.

### Ejemplo 8

El almacenamiento de tejidos de piel STRATAGRAFT® producidos usando procedimientos simplificados en cámaras de expedición durante hasta 15 días es altamente deseable ya que potenciaría la disponibilidad del tejido para uso clínico. Este ejemplo demuestra que el almacenamiento de equivalentes de piel producidos usando procedimientos simplificados en cámaras de expedición con agarosa nutriente durante hasta 15 días a 2 - 8 °C es aceptable.

#### Diseño experimental:

Tejidos STRATAGRAFT® producidos en el laboratorio de desarrollo de procesos de Stratatech se embalaron en cámaras de expedición con agarosa nutriente el día 31 del proceso de producción y se almacenaron a aproximadamente 2 - 8 °C durante 8 o 15 días. Los tejidos se analizaron para viabilidad, función barrera e histología después de los periodos de almacenamiento indicados.

#### **Resultados:**

##### Viabilidad:

Los datos de viabilidad de este estudio se muestran en la figura 7. Tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados durante 8 o 15 días cumplían los criterios de aceptación para viabilidad. La viabilidad del tejido disminuía a medida que el periodo de almacenamiento aumentaba. No obstante, los valores de viabilidad fueron altamente consistentes, y todos los valores sobrepasaron fácilmente el límite inferior.

5 Función barrera:

Los datos de función barrera se presentan a continuación en la figura 8. Todos los tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados a 2 - 8 °C durante 8 días o 15 días cumplían los criterios de aceptación para función barrera. Aunque los valores iniciales de DPM y los valores de cambio de DPM aumentaban ligeramente al aumentar el almacenamiento, la función barrera se conservó.

10 Histología:

En general, tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados a 2 - 8 °C durante 8 o 15 días mostraron todas las capas epidérmicas típicas encima de la dermis de colágeno que contiene fibroblastos. Se observaron varios efectos comunes relacionados con el almacenamiento en estos tejidos, incluyendo un incremento del número de núcleos condensados y una reducción de la tinción con eosina en las capas epidérmicas superiores.

15 Conclusiones:

Este estudio demuestra que tejidos de piel STRATAGRAFT® almacenados durante 8 o 15 días a 2-8 °C tienen viabilidad, función barrera e histología aceptables.

20 del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica no debe estar indebidamente limitada a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para los expertos en biología molecular, bioquímica o campos relacionados estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de expedición y almacenamiento de un equivalente de piel cultivado organotípicamente a un usuario, que comprende:
- 5 a) proporcionar dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente que comprende capas dérmica y epidérmica y un embalaje estéril que comprende un soporte de gel;  
b) embalar dicho equivalente de piel en un embalaje estéril en condiciones estériles de modo que dicho equivalente de piel contacte con dicho soporte de gel;  
c) rebajar la temperatura de dicho embalaje estéril a 2-8 grados Celsius;  
10 d) expedir dicho embalaje estéril a un usuario a 2-8 grados Celsius;  
e) almacenar dicho embalaje estéril en el sitio de uso a 2-8 grados Celsius, en el que la esterilidad e integridad del embalaje estéril se mantienen.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en la etapa b) dicho equivalente de piel contacta con dicho soporte de gel en una fecha de embalaje; y en la etapa e) la esterilidad e integridad del embalaje estéril se mantienen durante de 8 a 15 días desde dicha fecha de embalaje.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho soporte de gel está formado con un medio que comprende menos de 1 mg/ml de factores de crecimiento biológicamente activos y hormonas.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente comprende células NIKS.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho soporte de gel es un soporte de gel de agarosa.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho embalaje estéril es termosellable.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el equivalente de piel contacta con dicho soporte de gel mediante una membrana permeable.
8. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho medio es una mezcla de medio Eagle modificado por Dulbecco y medio F-12 de Ham y está libre de suero.
- 25 9. Un kit de embalaje de expedición y almacenamiento que comprende:
- a) una cámara de expedición que comprende
- i) un soporte de gel que comprende un medio, en el que dicho medio comprende menos de 1 mg/ml de factores de crecimiento biológicamente activos y hormonas;  
30 ii) un equivalente de piel cultivado organotípicamente que comprende capas dérmica y epidérmica, en el que dicho equivalente de piel está soportado sobre una membrana permeable en contacto con dicho soporte de gel;
- en el que dicha cámara de expedición está contenida dentro de una bolsita estéril; y  
b) compresas refrigerantes para mantener la temperatura a 2-8 grados Celsius durante la expedición y el  
35 almacenamiento.
10. El kit de la reivindicación 9, en el que dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente comprende células NIKS.
11. El kit de la reivindicación 9, en el que dicho soporte de gel es un soporte de gel de agarosa.
12. El kit de la reivindicación 9, en el que dicha cámara de expedición se embala en una bolsa estéril termosellable.
- 40 13. El kit de la reivindicación 9, en el que el equivalente de piel contacta con dicho soporte de gel mediante una membrana permeable.
14. El kit de la reivindicación 9, en el que dicho medio es una mezcla de medio Eagle modificado por Dulbecco y medio F-12 de Ham y está libre de suero.

FIGURA 1

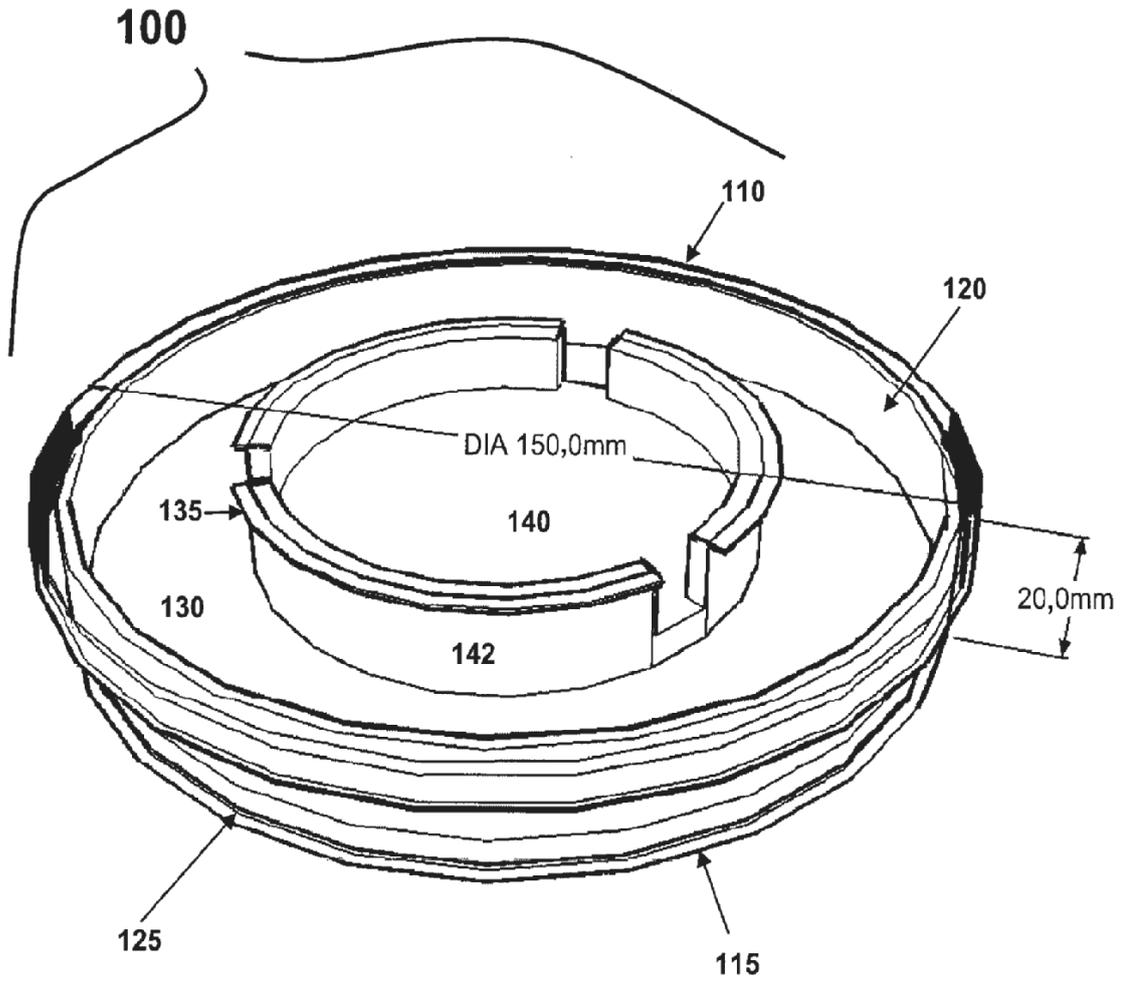


FIGURA 2. Gráficos de datos de viabilidad

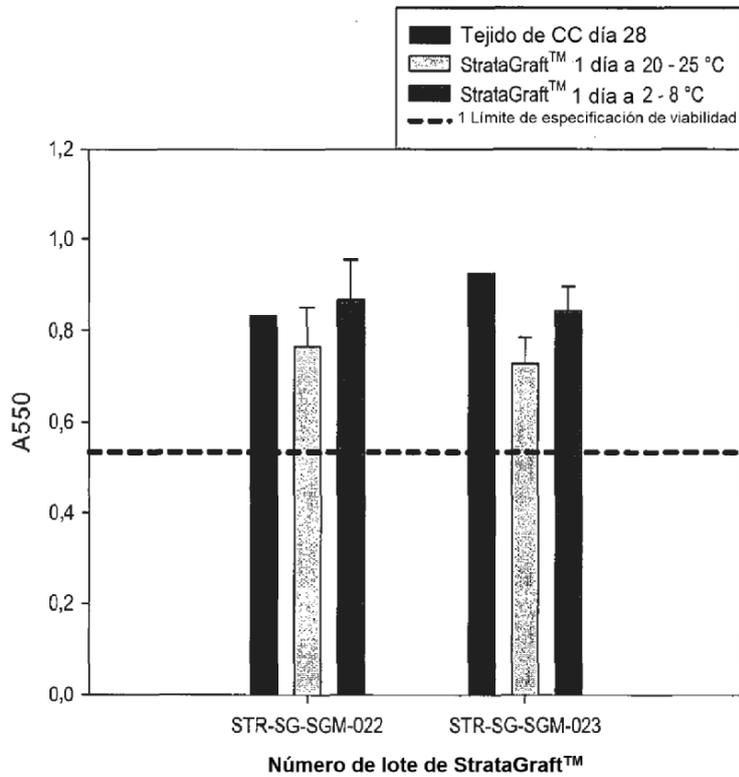
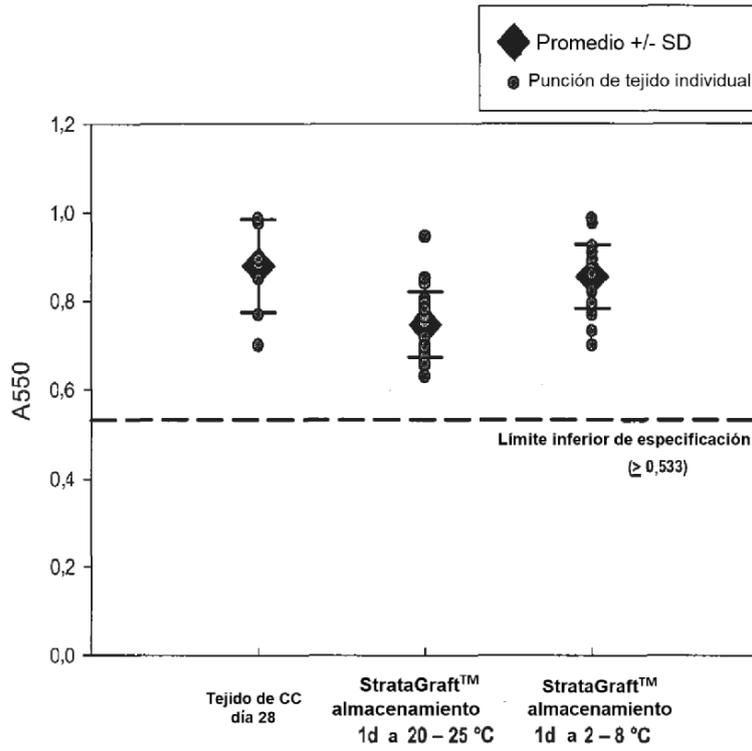


FIGURA 3. Gráficos de datos de viabilidad tisular

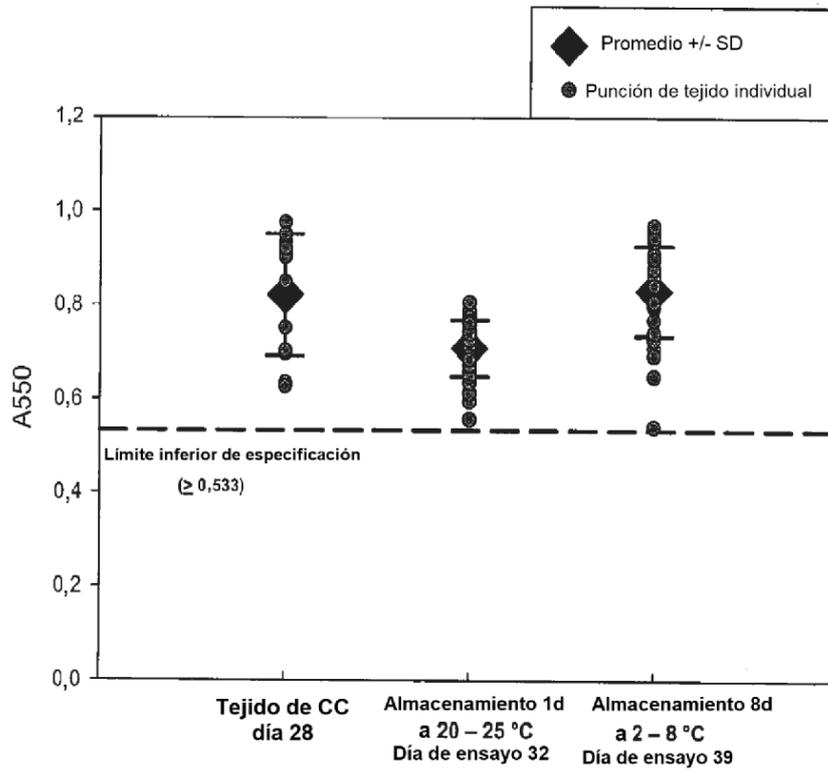
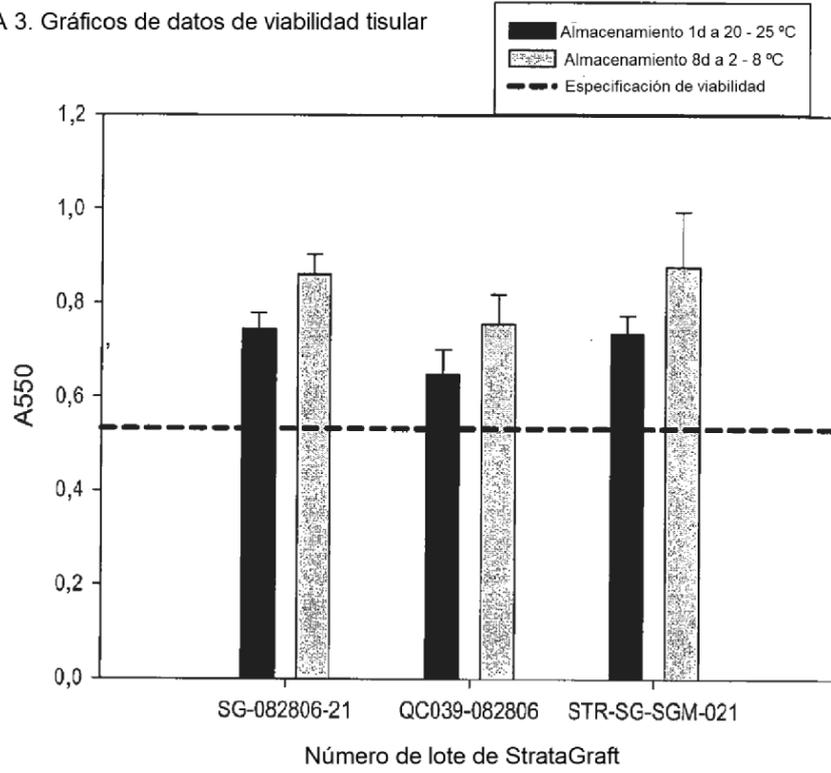


FIGURA 4. Gráfico de datos de viabilidad

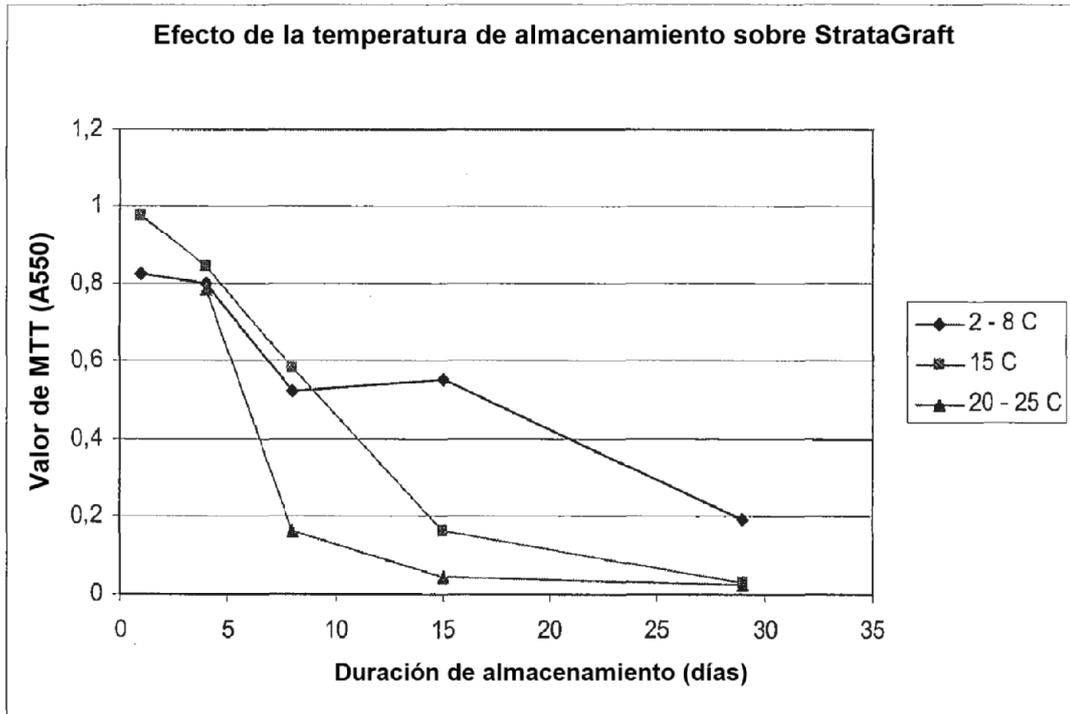


FIGURA 5. Gráfico de datos de viabilidad

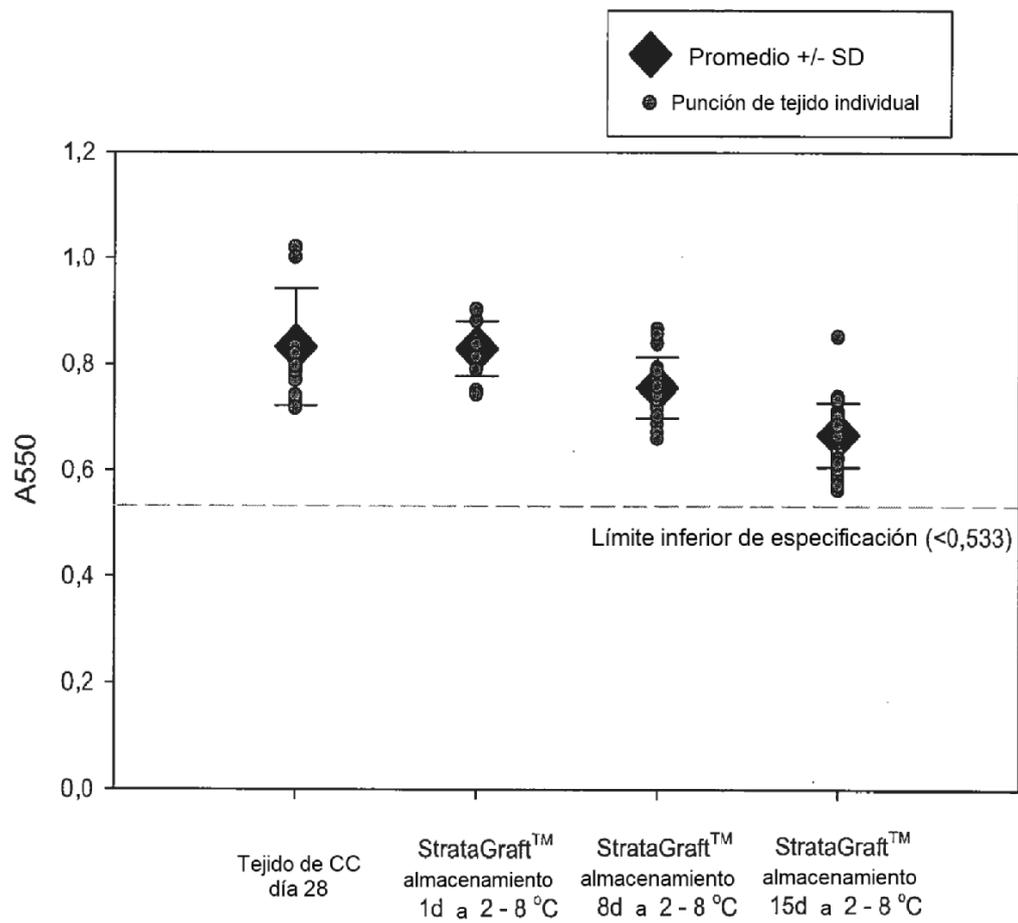
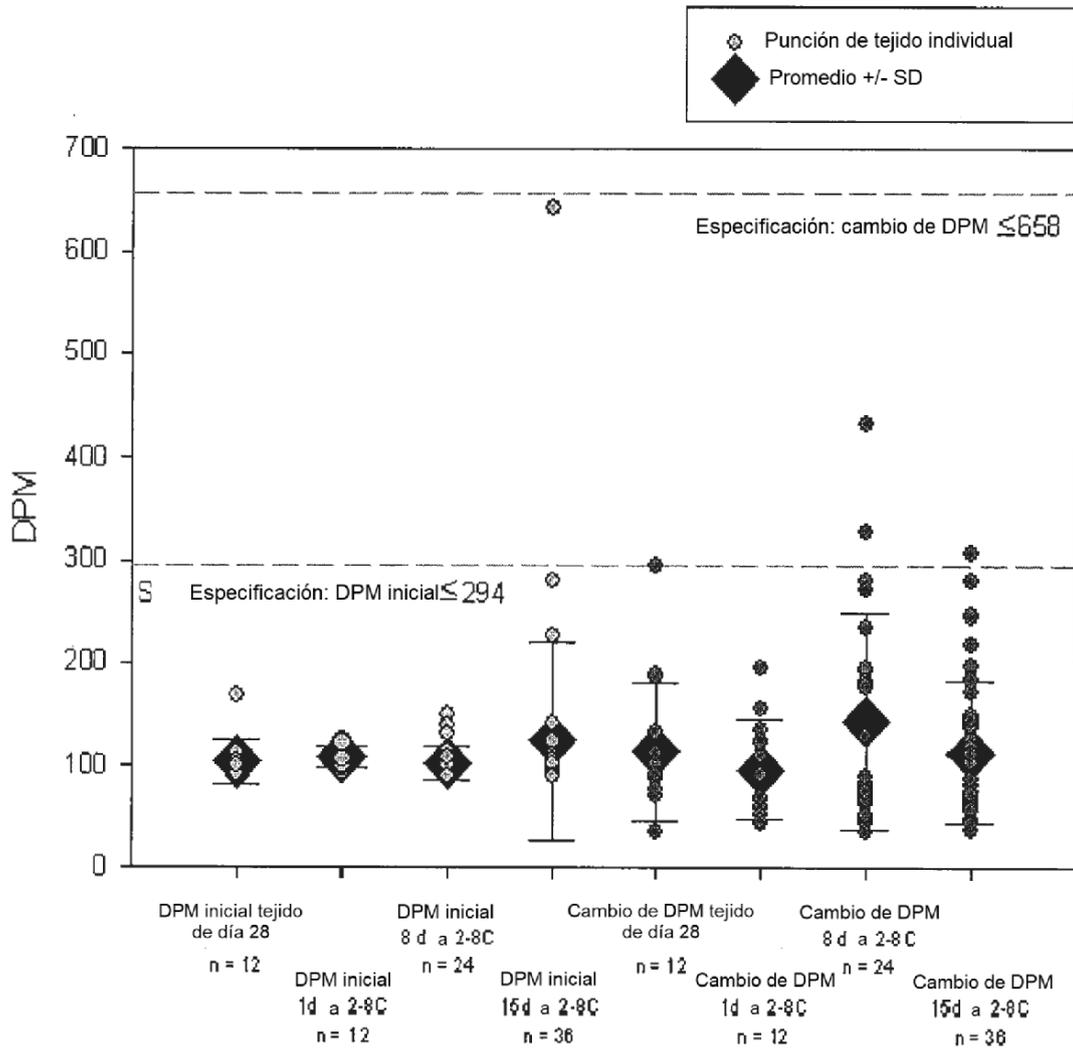


FIGURA 6. Gráfico de datos de función barrera



Número de tejido	Ubicación	A550	Promedio de tejido	Promedio del grupo
SG-031008-21 Tejido 1	Centro	0,960	0,892	
	Borde	0,834		
	Borde	0,878		
SG-031008-21 Tejido 2	Borde	0,897	0,905	0,908
	Centro	0,967		
	Borde	0,903		
SG-031008-21 Tejido 3	Borde	0,867	0,928	
	Borde	0,883		
	Centro	0,898		
SG-031708-20 Tejido 1	Centro	0,955	1,059	1,064
	Borde	0,855		
	Borde	1,004		
SG-031708-20 Tejido 2	Centro	0,996	1,062	
	Borde	1,134		
	Borde	1,007		
SG-031708-20 Tejido 3	Borde	1,100	1,070	
	Centro	1,060		
	Borde	1,062		
SG-031708-21 Tejido 1	Borde	1,031	0,968	
	Borde	1,096		
	Centro	1,091		
SG-031708-21 Tejido 2	Borde	0,929	0,990	0,970
	Borde	1,143		
	Borde	1,116		
SG-031708-21 Tejido 3	Borde	0,954	0,954	
	Borde	0,976		
	Borde	0,924		
SG-031708-21 Tejido 2	Borde	1,017	0,980	0,980
	Centro	1,037		
	Borde	0,920		
SG-031708-21 Tejido 3	Borde	1,031	0,980	
	Centro	1,018		
	Borde	0,877		
SG-042408-21 Tejido 1	Borde	1,041	0,980	
	Borde	0,878		
	Centro	0,944		
SG-042408-21 Tejido 2	Borde	0,990	0,980	
	Borde	0,939		
	Borde	1,046		

Número de tejido	Ubicación	A550	Promedio de tejido	Promedio del grupo	% del día 28
SG-031008-21 Tejido 1	Centro	0,818	0,821	0,828	91
	Borde	0,754			
	Borde	0,844			
SG-031008-21 Tejido 2	Borde	0,869	0,836		
	Centro	0,816			
	Borde	0,907			
SG-031008-21 Tejido 3	Borde	0,786	0,959	0,948	89
	Borde	0,777			
	Centro	0,961			
SG-031708-20 Tejido 1	Centro	0,948	0,938		
	Borde	0,918			
	Borde	0,924			
SG-031708-20 Tejido 2	Centro	0,963	0,807	0,823	85
	Borde	0,960			
	Borde	0,954			
SG-031708-21 Tejido 1	Centro	0,789	0,840		
	Borde	0,818			
	Borde	0,809			
SG-031708-21 Tejido 2	Borde	0,810	0,818	0,813	83
	Centro	0,878			
	Borde	0,823			
SG-031708-21 Tejido 3	Borde	0,837	0,822		
	Centro	0,812			
	Borde	0,826			
SG-042408-21 Tejido 1	Borde	0,814	0,800		
	Borde	0,818			
	Centro	0,826			
SG-042408-21 Tejido 2	Centro	0,810	0,800		
	Borde	0,823			
	Borde	0,830			
SG-042408-21 Tejido 3	Centro	0,800	0,825		
	Borde	0,797			
	Borde	0,777			

Número de tejido	Ubicación	A550	Promedio de tejido	Promedio del grupo	% del día 28
SG-031008-21 Tejido 3	Centro	0,711	0,755	0,754	83
	Borde	0,752			
	Borde	0,776			
SG-031008-21 Tejido 4	Borde	0,781	0,754		
	Centro	0,700			
	Borde	0,726			
SG-031708-20 Tejido 3	Borde	0,818	0,739	0,743	70
	Borde	0,770			
	Centro	0,739			
SG-031708-20 Tejido 4	Borde	0,748	0,748		
	Borde	0,762			
	Borde	0,742			
SG-031708-20 Tejido 1	Centro	0,745	0,767		
	Borde	0,730			
	Borde	0,715			
SG-042408-21 Tejido 1	Borde	0,764	0,746	0,741	76
	Centro	0,859			
	Borde	0,803			
SG-042408-21 Tejido 2	Borde	0,830	0,776		
	Borde	0,774			
	Centro	0,808			
SG-042408-21 Tejido 3	Borde	0,803	0,746		
	Centro	0,808			
	Borde	0,758			

Tejido de CC día 28

Almacenado 8 días a 2 - 8 C

Almacenado 15 días a 2 - 8 C

FIGURA 7

FIGURA 8

Tejido de CC día 28							Almacenado 8 días							Almacenado 15 días								
Numero de tejido	Ubicacion	DPM Inicial	Promedio del tejido	Promedio del grupo	DPM Inicial	Promedio del tejido	Numero de tejido	Ubicacion	DPM Inicial	Promedio del tejido	Promedio del grupo	DPM Inicial	Promedio del tejido	Promedio del grupo	Numero de tejido	Ubicacion	DPM Inicial	Promedio del tejido	Promedio del grupo	DPM Inicial	Promedio del tejido	Promedio del grupo
SG-031008-21 Tejido 1	Centro	90	106	105	20	105	SG-031008-21 Tejido 1	Centro	92	147	141	535	487	435	SG-031008-21 Tejido 3	Centro	224	174	180	368	430	427
	Borde	124			470			442	214			138				502	174			502		
	Borde	98			74			456	118			490				174	490					
SG-031008-21 Tejido 2	Centro	110	116	109	154	125	SG-031008-21 Tejido 2	Centro	120	135	141	318	383	423	SG-031708-20 Tejido 3	Borde	112	146	180	444	423	427
	Borde	106			110			432	112			448				112	444					
	Borde	94			110			432	112			448				112	444					
SG-031008-21 Tejido 3	Centro	110	105	105	154	92	SG-031708-20 Tejido 1	Centro	90	117	121	246	346	367	SG-031708-20 Tejido 4	Borde	154	191	171	432	409	401
	Borde	102			74			380	154			448				154	448					
	Borde	106			54			380	154			448				154	448					
SG-031708-20 Tejido 1	Centro	96	107	107	472	432	SG-031708-20 Tejido 2	Borde	108	128	128	302	389	367	SG-031708-20 Tejido 3	Centro	154	171	171	330	349	401
	Borde	118			472			302	154			330				154	330					
	Borde	114			376			368	154			330				154	330					
SG-031708-20 Tejido 2	Centro	94	104	105	220	345	SG-031708-21 Tejido 1	Centro	90	115	130	349	362	350	SG-031708-21 Tejido 2	Borde	154	160	148	440	248	273
	Borde	98			220			349	154			440				154	440					
	Borde	94			220			349	154			440				154	440					
SG-031708-20 Tejido 3	Centro	114	105	105	296	254	SG-042408-21 Tejido 1	Centro	120	146	146	350	338	350	SG-042408-21 Tejido 2	Borde	140	115	148	266	325	273
	Borde	96			296			350	140			266				140	266					
	Borde	104			184			350	140			266				140	266					
SG-031708-21 Tejido 1	Centro	100	102	107	532	462	SG-042408-21 Tejido 2	Borde	112	97	118	188	209	207	SG-042408-21 Tejido 3	Centro	132	171	171	320	248	273
	Borde	94			532			188	132			320				132	320					
	Borde	112			376			188	132			320				132	320					
SG-031708-21 Tejido 2	Centro	94	109	107	312	364	SG-042408-21 Tejido 3	Centro	120	127	118	210	214	207	SG-042408-21 Tejido 3	Borde	118	171	171	320	248	273
	Borde	94			312			210	118			320				118	320					
	Borde	102			312			210	118			320				118	320					
SG-042408-21 Tejido 1	Centro	112	135	135	208	206	SG-042408-21 Tejido 2	Centro	120	124	124	199	199	199	SG-042408-21 Tejido 3	Borde	184	171	171	278	248	273
	Borde	136			208			199	184			278				184	278					
	Borde	134			218			199	184			278				184	278					