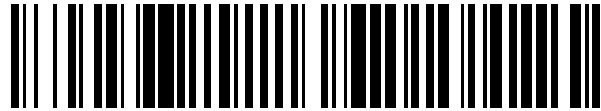


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 739**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/07**

(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.11.1999 E 05076319 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 1612265**

54 Título: **Constructos tisulares modificados por bioingeniería y métodos para producirlos y utilizarlos**

30 Prioridad:

**19.11.1998 US 109247 P**  
**24.06.1999 US 339632**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.05.2013**

73 Titular/es:

**ORGANOGENESIS INC. (100.0%)**  
**150 DAN ROAD**  
**CANTON, MA 02021, US**

72 Inventor/es:

**MURPHY, MICHAEL P. y**  
**RONFARD, VINCENT**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 402 739 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

Constructos tisulares modificados por bioingeniería y métodos para producirlos y utilizarlos

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención pertenece al campo de la ingeniería tisular. Esta invención se refiere a un método *in vitro* para inducir a las células a producir una matriz extracelular. Esta matriz extracelular viva, que tiene propiedades similares a las del tejido, puede usarse para realizar ensayos o con fines clínicos.

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El campo de la ingeniería tisular combina métodos de bioingeniería con los principios de las ciencias de la vida para entender las relaciones funcionales y estructurales en tejidos sanos y patológicos de mamíferos. El objetivo de la ingeniería tisular es el desarrollo y la aplicación en última instancia de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar las funciones del tejido. Así, mediante la ingeniería tisular, es posible diseñar y producir en el laboratorio un tejido modificado por bioingeniería. Los tejidos modificados por bioingeniería pueden incluir células que están normalmente asociadas a tejidos humanos o mamíferos naturales y matrices sintéticas o exógenas que sirven de andamio. El nuevo tejido modificado por bioingeniería debe ser funcional cuando se injerta en el receptor y debe incorporarse permanentemente en el cuerpo del receptor o ser biorremodelado progresivamente por células del paciente receptor. La fabricación de un tejido equivalente sin un miembro de soporte o un andamio supone un desafío científico en la creación de un nuevo tejido modificado por bioingeniería.

15

20

### RESUMEN DE LA INVENCION

25

La invención se refiere a constructos tisulares modificados por bioingeniería de células cultivadas y de componentes de la matriz extracelular producidos de forma endógena sin el requerimiento de componentes matriciales exógenos ni un soporte reticular ni miembros que sirvan de andamio. La invención puede, por tanto, de una manera ventajosa, producirse enteramente a partir de células humanas y componentes matriciales humanos producidos por esas células, por ejemplo, cuando el constructo tisular modificado por bioingeniería está diseñado para usarse en humanos.

30

La invención también se refiere a métodos para producir constructos tisulares estimulando células en cultivo, tales como fibroblastos, para producir componentes matriciales extracelulares sin la adición de componentes matriciales exógenos, de un soporte reticular ni de miembros que sirvan de andamio.

35

La invención también se refiere a métodos para producir constructos tisulares estimulando células en cultivo, tales como fibroblastos, para producir componentes de la matriz extracelular en un sistema de medio definido y/o sin el uso de componentes biológicos derivados de una fuente no humana o no definidos, tales como suero bovino o extractos de órganos.

40

Además, este constructo tisular puede prepararse por siembras en serie de diferentes tipos de células para producir un constructo tisular cultivado que imite la composición celular y las estructuras tisulares de los tejidos naturales.

45

Es más, el constructo tisular es producido y autoensamblado por células cultivadas sin la necesidad de un soporte que sirva de andamio o de la adición de componentes de la matriz extracelular exógenos.

Las características de resistencia de los constructos tisulares hacen que sean manipulables posibilitando que se separen y pelen fácilmente del aparato de cultivo en el que se forman, y que se trasplanten directamente sin la necesidad de ningún soporte o transportador en las aplicaciones clínicas o de ensayo.

50

Los constructos tisulares de la invención son útiles para fines clínicos tal como el injerto a un paciente con defectos en órganos o tejidos, tales como una úlcera o herida en la piel, o para ensayos tisulares *in vitro* o injertos en animales tales como para ensayos de seguridad o validación de productos farmacéuticos, cosméticos y químicos.

55

### DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un gráfico en el que se representa el aumento en la concentración de colágeno determinada por el ensayo de la hidroxiprolina en comparación con el número de células en el constructo dérmico derivado de células de prepucio humano de neonatos descrito en el ejemplo 1.

60

La figura 2 es una microfotografía (objetivo 20X) de una sección fijada, embebida en parafina, y teñida con hematoxilina y eosina de un constructo célula-matriz formado a partir de fibroblastos dérmicos humanos cultivados en un medio químicamente definido durante 21 días. La membrana porosa aparece como una banda delgada translúcida debajo del constructo.

La figura 3 muestra las imágenes de dos ampliaciones, obtenidas con un microscopio electrónico de transmisión, de un constructo célula-matriz formado a partir de fibroblastos dérmicos humanos cultivados en un medio químicamente definido durante 21 días. La figura 3A es una ampliación 7600X que muestra una matriz endógena que incluye el alineamiento de las fibras de colágeno entre los fibroblastos. La figura 3B es una ampliación 19000X de fibras de colágeno endógenas totalmente formadas con una disposición y un empaquetamiento fibrilares.

La figura 4 es una microfotografía (objetivo 20X) de una sección fijada, embebida en parafina y teñida con hematoxilina y eosina, de un constructo de piel cultivado formado en un medio químicamente definido en ausencia de componentes matriciales exógenos que comprende un constructo célula-matriz formado a partir de fibroblastos dérmicos humanos cultivados en un medio químicamente definido con una epidermis diferenciada y en multicapas formada a partir de queratinocitos humanos cultivados en un medio químicamente definido.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Hasta ahora, los constructos tisulares vivos modificados actuales no tienen las células completamente ensambladas y deben depender de la adición o incorporación de componentes matriciales exógenos o miembros sintéticos estructurales o de soporte, o ambos.

Los constructos tisulares modificados por bioingeniería descritos en la presente muestran muchas de las características naturales del tejido del cual se derivan sus células. Los constructos tisulares así producidos pueden emplearse en injertos en pacientes o para ensayos *in vitro*.

Una realización preferida es un constructo célula-matriz que comprende un primer tipo de células y una matriz extracelular producida endógenamente donde el primer tipo de células es capaz de sintetizar y secretar la matriz extracelular para producir el constructo célula-matriz.

Otra realización preferida es un constructo bicapa que comprende un primer tipo de células y una matriz extracelular producida endógenamente y una capa de células de un segundo tipo dispuesta sobre o dentro del constructo célula-matriz formado por el primer tipo de células.

Una realización más preferida es un constructo célula-matriz que comprende fibroblastos, tales como aquellos derivados de la dermis, para formar un constructo dérmico cultivado.

Otra realización más preferida es un constructo célula-matriz que comprende fibroblastos, tales como aquellos derivados de la dermis, para formar un constructo dérmico cultivado con una capa de queratinocitos cultivados sobre él para formar una capa epidérmica y dar lugar a un constructo de piel bicapa cultivado. Los constructos de piel cultivados de la invención expresan muchas características físicas, morfológicas y bioquímicas de la piel natural.

En una realización aún más preferida, el constructo célula-matriz es un constructo tisular que es similar a la capa dérmica de la piel, un constructo dérmico humano que se forma en un sistema definido que comprende células derivadas de seres humanos y que no utiliza componentes químicos sin definir durante su cultivo.

En la realización más preferida, los constructos tisulares de la invención se fabrican en un sistema químicamente definido que comprende células derivadas de seres humanos pero no células ni componentes biológicos no humanos o químicamente no definidos.

Una realización preferida de la invención comprende una capa estructural de al menos un tipo de células productoras de la matriz extracelular y componentes matriciales extracelulares producidos endógenamente, denominados más simplemente "matriz", donde la matriz es sintetizada completamente por las células y se ensambla cultivando las células. Esta capa se denomina en la presente un "constructo célula-matriz" o una "capa célula-matriz" ya que las células secretan la matriz y están ellas mismas contenidas en y a lo largo de su matriz. Los constructos tisulares cultivados no requieren, por tanto no incluyen, componentes matriciales exógenos, es decir, componentes matriciales no producidos por las células cultivadas sino introducidos por otros medios. En una realización más preferida, se muestra que el constructo célula-matriz producido por fibroblastos dérmicos humanos tiene una concentración predominante de colágeno similar a la de la piel natural. Como se pone en evidencia por microscopía electrónica, la matriz es de naturaleza fibrosa y comprende colágeno que muestra el patrón de bandas de 67 nm escalonado un cuarto de su longitud, así como la organización de empaquetamiento de fibrillas y haces de fibrillas similar a la del colágeno natural. La SDS-PAGE en condiciones reductoras retardadas ha detectado la presencia de colágeno de los tipos I y III, los tipos de colágeno predominantes hallados en piel humana natural, en estos constructos. Usando técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) estándar, el constructo célula-matriz dérmico da positivo para el ensayo de tinción de la decorina, un proteoglicano de tipo sulfato de dermatán que se sabe que se asocia con las fibrillas de colágeno y que se cree que regula el diámetro de la fibrilla *in vivo*. La decorina también se puede visualizar en el constructo con MET. El tejido producido también da positivo para el ensayo de tinción de la tenascina, una glicoproteína de la matriz extracelular que se encuentra, por ejemplo, en el mesénquima o en los tejidos que están reparándose. De manera muy semejante al tejido que está reparándose *in vivo*, el tejido producido en el cultivo ha mostrado que aumenta su proporción de colágeno de tipo I respecto al tipo III según se forma la

matriz. Aunque sin querer restringirse a la teoría, se cree que las células rellenan el espacio abierto entre ellas rápidamente con una matriz laxa análoga al tejido de granulación compuesto principalmente por colágeno de tipo III y fibronectina, y entonces remodelan esta matriz laxa con una matriz más densa que comprende principalmente colágeno de tipo I. Se ha comprobado que la célula-matriz producida contiene glicosaminoglicanos (GAG), tal como ácido hialurónico (AH); fibronectina; proteoglicanos además de decorina tales como biglicano y versicano; y un perfil de glicosaminoglicanos sulfatados tales como el ácido dihalurónico, 0-sulfato de dicondroitina, 4-sulfato de dicondroitina, 6-sulfato de dicondroitina, 4,6-sulfato de dicondroitina, 4-sulfato de dicondroitina-UA-2S y 6-sulfato de dicondroitina-UA-2S. Estas características estructurales y bioquímicas se manifiestan según se desarrolla el constructo en el cultivo y son claramente evidentes cuando el constructo se acerca a su forma final. La presencia de estos componentes en constructos célula-matriz dérmicos cultivados totalmente formados indica que el constructo tiene unas características estructurales y bioquímicas similares a las de una dermis normal.

Aunque la lista mencionada anteriormente es una lista de características bioquímicas y estructurales de un constructo célula-matriz cultivado formado a partir de fibroblastos dérmicos, debe reconocerse que los constructos célula-matriz cultivados formados a partir de otros tipos de fibroblastos producirán muchas de estas características y otras fenotípicas del tipo de tejido del cual se originan. En algunos casos, se puede inducir a los fibroblastos a expresar componentes no fenotípicos por exposición o contacto químico, estreses físicos o por medios transgénicos. Otra realización preferida de la invención es una capa célula-matriz que tiene una segunda capa de células dispuesta sobre ella. La segunda capa de células se cultiva sobre la capa célula-matriz para formar un constructo tisular de dos capas modificado por bioingeniería. En una realización más preferida, las células de la segunda capa son de origen epitelial. En la realización más preferida, la segunda capa comprende queratinocitos humanos cultivados que, junto con una primera capa célula-matriz, un constructo célula-matriz formado a partir de fibroblastos dérmicos y una matriz endógena para formar una capa dérmica, comprende un constructo dérmico vivo. Cuando está totalmente formada, la capa epidérmica es una capa de queratinocitos que comprende varias capas, estratificada y bien diferenciada que muestra una capa basal, una capa suprabasal, una capa granulada y un estrato córneo. El constructo de piel tiene una membrana basal bien desarrollada presente en la unión dermis-epidermis según lo muestra la microscopía electrónica de transmisión (MET). La membrana basal muestra su mayor grosor alrededor de los hemidesmosomas, marcados por fibrillas de anclaje constituidas por colágeno de tipo VII, tal y como se ve por MET. Se puede ver que las fibrillas de anclaje salen de la membrana basal y atrapan las fibrillas de colágeno en la capa dérmica. Estas fibrillas de anclaje, así como otros componentes de la membrana basal, son secretados por los queratinocitos. Se sabe también que, mientras los queratinocitos son capaces de secretar por ellos mismos componentes de la membrana basal, una membrana basal reconocible no se formará si no hay fibroblastos presentes. La tinción inmunohistoquímica de un constructo de piel de la presente invención también ha mostrado que está presente la laminina, una proteína de la membrana basal.

En un método preferido de la invención, para formar un constructo célula-matriz se siembra en un sustrato un primer tipo celular, un tipo celular productor de la matriz extracelular, se cultiva y se induce a dicho tipo celular a sintetizar y secretar una matriz extracelular organizada alrededor de ellos para formar un constructo célula-matriz. En otro método preferido de la invención, se siembra una superficie del constructo célula-matriz con células de un segundo tipo celular y se cultivan para formar un constructo tisular compuesto de dos capas. En un método más preferido, se forma un constructo de piel con su grosor completo y que tiene características similares a las de la piel humana natural cultivando fibroblastos, tales como fibroblastos dérmicos humanos, bajo condiciones suficientes para inducir la síntesis de la matriz para formar una célula-matriz de células dérmicas y matriz, una capa dérmica, en la que las células epiteliales humanas, tales como los queratinocitos, se siembran y cultivan bajo condiciones suficientes para formar una capa epidérmica totalmente diferenciada y estratificada.

Por tanto, un método para obtener los constructos tisulares de la presente invención comprende:

1. (a) cultivar al menos un tipo celular productor de la matriz extracelular en ausencia de componentes matriciales extracelulares exógenos o de un miembro de soporte estructural; y
2. (b) estimular las células del paso (a) para sintetizar, secretar y organizar componentes matriciales extracelulares para formar un constructo tisular compuesto de células y de matriz sintetizada por esas células; donde los pasos (a) y (b) pueden llevarse a cabo simultánea o consecutivamente.

Formar un constructo tisular con dos capas constituido por un constructo célula-matriz y una segunda capa de células sobre el mismo, el método comprende adicionalmente el paso de: (c) cultivar células de un segundo tipo celular en la superficie del constructo tisular formado para producir un constructo tisular de dos capas.

Un tipo celular productor de matriz extracelular para usarlo en la invención puede ser cualquier tipo celular capaz de producir y secretar componentes matriciales extracelulares y de organizar los componentes matriciales extracelulares para formar un constructo célula-matriz. Más de un tipo celular productor de la matriz extracelular puede cultivarse para formar un constructo célula-matriz. Células de diferentes orígenes celular o tisular pueden cultivarse juntas como una mezcla para producir componentes complementarios y estructuras similares a aquellas que se encuentran en los tejidos naturales. Por ejemplo, el tipo celular productor de la matriz extracelular puede tener otros tipos celulares mezclados con él para producir una cantidad de matriz extracelular que no es producida normalmente por el primer tipo celular. Como alternativa, el tipo celular productor de la matriz extracelular puede

mezclarse también con otros tipos celulares que forman estructuras tisulares especializadas en el tejido pero que no contribuyen sustancialmente a la formación global del componente matricial del constructo célula-matriz, tal como en ciertos constructos de piel de la invención.

5 Aunque de acuerdo con esta invención se puede utilizar cualquier tipo celular productor de la matriz extracelular, los tipos celulares preferidos para usar en esta invención se derivan de la mesénquima. Más preferentemente, los tipos celulares son fibroblastos, células estromales y otras células del tejido conjuntivo de soporte, más preferentemente fibroblastos dérmicos humanos que se encuentran en la dermis humana para la producción de un constructo dérmico humano. Las células de fibroblastos, generalmente, producen un número de proteínas matriciales extracelulares, principalmente colágeno. Hay varios tipos de colágenos producidos por los fibroblastos, sin embargo, el colágeno de tipo I es el predominante *in vivo*. Las cepas celulares de fibroblastos humanos pueden derivarse de un número de fuentes, que incluyen pero no se limitan al prepucio de neonatos masculinos, dermis, tendón, pulmón, cordones umbilicales, cartílago, uretra, estroma corneal, mucosa oral e intestino. Las células humanas pueden incluir, pero no tienen por qué limitarse a, fibroblastos, pero pueden incluir: células de músculo liso, condrocitos y otras células de tejido conjuntivo de origen mesenquimático. Se prefiere, pero no se necesita, que el origen de la célula productora de la matriz utilizada en la producción de un constructo tisular se derive de un tipo tisular al que ha de asemejar o imitar después de utilizar los métodos de cultivo de la invención. Por ejemplo en la realización donde se produce un constructo de piel, la célula productora de matriz preferida es un fibroblasto, preferiblemente de origen dérmico. En otra realización preferida, los fibroblastos aislados de la papila dérmica o del folículo piloso por microdissección pueden usarse para producir la matriz sola en asociación con otros fibroblastos. En la realización donde se produce un constructo córneo, la célula productora de la matriz se deriva del estroma corneal. Los donantes de células pueden variar con la edad y el desarrollo.

25 Aunque se prefiere usar células humanas en la invención, las células que se usan en este método no están limitadas a células de orígenes humanos. Se pueden utilizar células de otras especies de mamíferos que incluyen, pero no se limitan a, fuentes equinas, caninas, porcinas, bovinas y ovinas; o especies de roedores como ratones o ratas. Es más, también pueden usarse en esta invención células que se transfectan química, vírica o espontáneamente o células recombinantes o modificadas por ingeniería genética. Para esas realizaciones que incorporan más de un tipo celular, se pueden utilizar mezclas químicas de células normales de dos o más fuentes; mezclas de células normales y modificadas genéticamente o transfectadas; o mezclas de células de dos o más especies o de fuentes tisulares.

35 En la producción del constructo célula-matriz se pueden utilizar células recombinantes o modificadas por ingeniería genética para crear un constructo tisular que actúa como un injerto que libera el fármaco en un paciente necesitado de mayores niveles de productos celulares naturales o de tratamiento con un agente terapéutico. Las células pueden producir y liberar en el paciente, a través del injerto, productos celulares recombinantes, factores de crecimiento, hormonas, péptidos o proteínas durante un período continuo de tiempo o según se necesite cuando tenga lugar una señalización biológica, química o térmica debido a las condiciones presentes en el paciente. Es deseable tanto la expresión de productos génicos a corto o largo plazo, dependiendo de la indicación de uso del cultivo del constructo tisular. La expresión a largo plazo es deseable cuando el constructo tisular cultivado se implanta para administrar productos terapéuticos a un paciente durante un periodo de tiempo prolongado. En cambio, la expresión a corto plazo es deseable en casos donde el constructo tisular cultivado se injerta en un paciente que tiene una herida donde las células del constructo tisular cultivado tienen como objetivo favorecer la curación normal o cercana a la normalidad o reducir la escarificación de la herida. Una vez que la herida se ha curado, los productos génicos del cultivo tisular cultivado ya no son necesarios y pueden no ser deseables en el sitio. Las células pueden también modificarse por ingeniería genética para expresar proteínas o diferentes tipos de componentes matriciales extracelulares que son "normales" pero que se expresan a niveles más altos o modificados de alguna manera para hacer un dispositivo implantable, que comprende una matriz extracelular y células vivas, que es terapéuticamente ventajoso para mejorar la cicatrización de la herida, facilitar o dirigir la neovascularización, o minimizar la formación de cicatrices o queloides. Estos procedimientos son generalmente conocidos en la técnica, y se describen en Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), incorporados aquí por referencia. Todos los tipos de células mencionados anteriormente se incluyen en la definición de una "célula productora de la matriz" según se usa en esta invención.

55 El componente matricial extracelular mayoritariamente predominante producido por los fibroblastos es colágeno fibrilar, en particular el colágeno de tipo I. El colágeno fibrilar es un compuesto clave en la estructura célula-matriz; sin embargo, esta invención no se limita a las matrices compuestas solo de esta proteína o tipo de proteína. Por ejemplo, otros colágenos, colágenos fibrilares y no fibrilares de la familia del colágeno tales como colágenos de los tipos II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, pueden producirse usando el tipo de célula apropiado. De manera similar, otras proteínas matriciales que pueden producirse y depositarse usando el método actual incluyen, pero no se limitan a, elastina; proteoglicanos tales como decorina o biglicano; o glicoproteínas tal como tenascina; vitronectina; fibronectina; laminina, trombospondina I y glicosaminoglicanos (GAG) tal como el ácido hialurónico (AH).

65 Las células productoras de la matriz se cultivan en un recipiente adecuado para el cultivo de células animales o

tejido, tales como una placa, matraz o botella rotatoria de cultivo, que permite la formación de una estructura tridimensional similar a la del tejido. Superficies para el crecimiento celular adecuadas, en las que las células se pueden cultivar, pueden ser cualquier material biológicamente compatible al cual las células puedan adherirse y que proporcione medios de anclaje para que se forme el constructo célula-matriz. Materiales tales como cristal; acero inoxidable; polímeros, incluidos el policarbonato, poliestireno, cloruro polivinílico, polivinilideno, polidimetilsiloxano, fluoropolímeros y etilenpropileno fluorado; y sustratos de silicona, incluidos la sílice fundida, polisilicona, o cristales de silicona pueden utilizarse como superficies de crecimiento celular. El material de la superficie de crecimiento celular puede estar químicamente tratada o modificada, cargada electrostáticamente o revestida con compuestos biológicos tales como la poli-1-lisina o los péptidos. Un ejemplo de un péptido de recubrimiento es el péptido RGD.

Aunque el constructo tisular de la invención puede cultivarse en una superficie de crecimiento celular sólida, se prefiere una superficie de crecimiento celular con poros que comuniquen las caras superior e inferior de la membrana para permitir un contacto bilateral del medio con el constructo tisular que se está desarrollando o contacto solo con la parte que está debajo del cultivo. El contacto bilateral permite al medio estar en contacto con las superficies inferior y superior del constructo en desarrollo y la exposición de una mayor superficie a los nutrientes contenidos en el medio. El medio también puede estar en contacto solo con la parte inferior del constructo tisular cultivado en formación, de modo que la superficie superior puede estar expuesta al aire, como en el desarrollo de un constructo de piel cultivado. El recipiente de cultivo preferido es uno que utiliza un inserto portador, una membrana permeable tratada para cultivo tal como una membrana porosa que está suspendida en el recipiente de cultivo que contiene el medio. Típicamente, la membrana se asegura a un extremo de un miembro tubular o un armazón que se inserta dentro y está en contacto con una base, tal como una placa petri o de cultivo que puede cubrirse con una tapa. Los recipientes de cultivo que incorporan un inserto portador con una membrana porosa son conocidos en la técnica y se prefieren para llevar a cabo la invención y se describen en un número de patentes del campo de los Estados Unidos, algunas de las cuales están comercialmente disponibles, incluyendo por ejemplo: 5.766.937, 5.466.602, 5.366.893, 5.358.871, 5.215.920, 5.026.649, 4.871.674, 4.608.342, cuyos contenidos se incorporan aquí. Cuando se emplean estos tipos de recipientes de cultivo, el constructo tisular se produce en una superficie de la membrana, preferentemente en la superficie superior, que mira hacia arriba y el cultivo está en contacto con el medio celular en tanto en la superficie inferior como la superior. Los poros en la superficie de crecimiento permiten el paso del medio de cultivo a través de la membrana para proporcionar nutrientes a la parte inferior del cultivo, permitiendo así nutrir a las células de manera bilateral o sólo desde la cara inferior. Un tamaño de poro preferido es uno que es lo suficientemente pequeño para no permitir el crecimiento de células a través de la membrana, pero sin embargo lo suficientemente grande para permitir el libre paso de nutrientes contenidos en el medio de cultivo a la superficie inferior del constructo célula-matriz, tal como por acción capilar. Los tamaños preferidos de poro son de alrededor de menos de 3 micrones pero los tamaños de poro empleados aquí están en un intervalo entre alrededor de 0,1 micrones a alrededor de 3 micras, más preferentemente entre alrededor de 0,2 micrones a alrededor de 1 micra y más preferentemente alrededor de 0,4 micrones a alrededor de 0,6 micrones. En el caso de fibroblastos dérmicos humanos, el material más preferido es policarbonato con un tamaño de poro entre alrededor de 0,4 a alrededor de 0,6 micrones. El tamaño máximo de poro depende no sólo del tamaño de la célula sino también de la capacidad de la célula para cambiar su forma y pasar a través de la membrana. Es importante que el constructo similar al tejido se adhiera a la superficie pero no incorpore o envuelva el sustrato, de modo que se pueda separar del mismo por pelado con una fuerza mínima. El tamaño y la forma del constructo tisular formado están determinados por el tamaño de la superficie del recipiente o de la membrana sobre la que crece. Los sustratos pueden ser redondeados o angulares o formados de tal manera que tengan ángulos de esquina redondeados, o con forma irregular. Los sustratos también pueden de ser planos o contorneados como un molde para producir un constructo con una forma determinada que esté en contacto con una herida o imite la estructura física del tejido natural. Para conseguir mayores áreas de superficie del sustrato de crecimiento, se siembran más células de manera proporcional a la superficie y se necesita un mayor volumen de medio para bañar y nutrir de manera suficiente las células. Cuando el constructo tisular se forma finalmente, sea un constructo célula-matriz de una única capa o un constructo de dos capas, se separa por pelado de la membrana de sustrato antes de injertarlo en un paciente.

Los constructos tisulares cultivados de la invención no están basados en miembros sintéticos o biorreabsorbibles, tal como una malla para formar constructos tisulares. El miembro de malla se clasifica como un material tejido, material de punto o material de fieltro. En los sistemas donde se utiliza un miembro de malla, las células se cultivan en el miembro de malla y crecen en cualquiera de las dos caras y entre los intersticios de la malla para envolver e incorporar la malla en el constructo tisular cultivado. El constructo final formado por métodos que incorporan una malla de ese tipo depende de dicha malla para conseguir grosor y soporte físico. En las patentes de EE. UU. Número 5.580.781, 5.443.950, 5.266.480, 5.032.508, 4.963.489 y Naughton et al se encuentran ejemplos de constructos tisulares cultivados que dependen de miembros de malla sintéticos.

El sistema de producción de la capa célula-matriz puede ser estático o puede emplear un medio de perfusión para el medio de cultivo. En el sistema estático, el medio de cultivo está quieto y relativamente inmóvil en contraste al sistema de perfusión donde el medio está en movimiento. La perfusión del medio afecta a la viabilidad de las células y aumenta el desarrollo de la capa matricial. Los medios de perfusión incluyen, pero no se limitan a: utilizar una barra de agitación magnética o un impulsor motorizado en el medio de cultivo subyacente (debajo) o adyacente al

portador del sustrato que contiene la membrana del cultivo para agitar el medio; bombear el medio en y a través de la placa o cámara del cultivo; agitar suavemente la placa de cultivo en una plataforma agitadora o rotatoria; o haciéndolo rodar si se produce en una botella rotatoria. Un técnico versado en la materia puede elegir otros medios de perfusión que pueden usarse en el método de la invención.

Las formulaciones de medios de cultivo adecuadas para usar en la presente invención se seleccionan dependiendo de los tipos de células que se van a cultivar y de los constructos tisulares que se van a producir. El medio de cultivo que se usa y las condiciones de cultivo específicas que se necesitan para favorecer el crecimiento celular, la síntesis de la matriz y la viabilidad dependerán del tipo de célula que se está cultivando.

En algunos casos, tal como en la fabricación de constructos de piel de dos capas modificados por bioingeniería de la presente invención, la composición del medio varía con cada etapa de la fabricación ya que diferentes objetivos necesitan suplementaciones diferentes. En un método preferido, la capa célula-matriz se forma bajo condiciones definidas, esto es, se cultiva en un medio químicamente definido. En otro método preferido, un constructo tisular comprende una capa célula-matriz provista de una segunda capa de células dispuestas y cultivadas sobre ella donde ambos tipos de células se cultivan en un sistema con un medio de cultivo definido. Como alternativa, el constructo tisular comprende una capa célula-matriz fabricada bajo condiciones de medio definidas y una segunda capa formada sobre ella bajo condiciones de medio no definidas. En un caso contrario, el constructo tisular comprende una capa célula-matriz que puede ser fabricada bajo condiciones de medio no definidas y la segunda capa se forma sobre ella bajo condiciones de medio definidas.

Se prefiere el uso de un medio de cultivo químicamente definido, es decir, un medio libre de extractos tisulares o de órganos animales no definidos, por ejemplo, suero, extracto pituitario, extracto hipotalámico, extracto de placenta, o extracto embrionario o proteínas y factores secretados por células de soporte. En una realización más preferida, el medio está libre de componentes no definidos y de componentes biológicos definidos derivados de fuentes no humanas. Aunque no se prefiere la adición de componentes no definidos, pueden usarse de acuerdo con los métodos expuestos en cualquier momento del cultivo para fabricar un constructo tisular con éxito. Cuando la invención se lleva a cabo utilizando células humanas cribadas cultivadas usando componentes químicamente definidos que no están derivados de fuentes animales no humanas, el constructo tisular resultante es un constructo tisular humano definido. Se pueden adicionar equivalentes funcionales sintéticos para suplementar el medio químicamente definido en el ámbito de la definición de lo químicamente definido para usar en el método de fabricación más preferido. Generalmente, un técnico versado en el campo del cultivo celular será capaz de determinar equivalentes humanos naturales, humanos recombinantes o sintéticos adecuados de compuestos animales comúnmente conocidos para suplementar el medio de cultivo de la invención sin una investigación o experimentación excesiva. Las ventajas de utilizar un constructo tal en la clínica es que la probabilidad de infección y contaminación accidental vírica animal o entre especies disminuye. En la situación del ensayo, las ventajas de un constructo químicamente definido es que cuando se prueba, no hay posibilidad de confundir los resultados debido a la presencia de componentes indefinidos.

El medio de cultivo comprende una base de nutrientes normalmente suplementada con otros componentes. El técnico con experiencia en el campo podrá determinar bases de nutrientes apropiadas en la técnica de cultivos celulares animales con una esperanza razonable de producir de manera exitosa el constructo tisular de la invención. Muchas fuentes comercialmente disponibles de nutrientes son útiles en la práctica de la presente invención. Estas incluyen fuentes de nutrientes comercialmente disponibles que proporcionan sales inorgánicas, una fuente de energía, aminoácidos y vitaminas del grupo B tal como el medio Eagle modificado por Dubelcco (DMEM); el medio esencial mínimo (MEM); M199; RPMI 1640; el medio Dubelcco modificado por Iscove (EDMEM). El medio esencial mínimo (MEM) y el M199 requieren una suplementación adicional con precursores de fosfolípidos y aminoácidos no esenciales. Mezclas ricas en vitaminas comercialmente disponibles que suministran aminoácidos, ácidos nucleicos, cofactores enzimáticos, precursores de fosfolípidos y sales inorgánicas incluyen Ham's F-12, Ham's F-10, NCTC 109 y NCTC 135. Aunque en concentraciones variables, todos los medios basales proporcionan una fuente básica de nutrientes para las células en forma de glucosa, aminoácidos, vitaminas e iones inorgánicos, junto con otros componentes del medio básicos. El medio basal más preferido de la invención comprende una base de nutrientes del medio Eagle modificado por Dulbecco libre de calcio o con una baja cantidad de calcio, o, como alternativa, DMEM y Ham's F-12 en una proporción de entre 3 a 1 y 1 a 3, respectivamente.

El medio basal se suplementa con componentes tales como aminoácidos, factores de crecimiento y hormonas. El medio de cultivo definido para el cultivo de las células de la invención se describe en la patente de los EE. UU. número 5.712.163 de Parenteau y en la publicación internacional PCT número WO 95/31473, incorporándose aquí por referencia las descripciones de las mismas. Se conocen otros medios en la técnica tales como los descritos en Ham y McKeehan, *Methods in Enzymology*, 58:44-93 (1979) o en Bottenstein y col, *Methods in Enzymology*, 58:94-109 (1979) para otros medios químicamente definidos apropiados. En la realización preferida, el medio basal se suplementa con los siguientes componentes conocidos para los técnicos experimentados en el cultivo de células animales: insulina, transferrina, triyodotironina (T3) y etanolamina o o-fosforil-etanolamina o ambas, donde el técnico experto puede determinar las concentraciones y sustituciones para los suplementos.

- La insulina es una hormona polipeptídica que promueve la absorción de glucosa y aminoácidos para proporcionar beneficios a largo plazo sobre múltiples pases de células. La suplementación con insulina o el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) es necesaria para los cultivos a largo plazo ya que, finalmente, habrá una merma de la habilidad de las células para absorber glucosa y aminoácidos y una posible degradación del fenotipo celular. La insulina puede derivarse de fuentes animales, por ejemplo bovina, humanas o por medios recombinantes como insulina humana recombinante. Por tanto, una insulina humana podría clasificarse como un componente químicamente definido no derivado de una fuente biológica no humana. Es aconsejable la suplementación con insulina para el cultivo en serie y se proporciona al medio en un amplio intervalo de concentraciones. Un intervalo preferido de concentraciones es entre alrededor de 0,1 µg/ml a alrededor de 500 µg/ml, más preferentemente de alrededor de 5µg/ml a alrededor de 400 µg/ml, y más preferentemente de alrededor de 375 µg/ml. Concentraciones apropiadas para la suplementación de factores de crecimiento similares a la insulina, tales como IGF-1 e IGF-2, para los tipos celulares elegidos para el cultivo pueden determinarse fácilmente por alguien experto en la técnica.
- La transferrina está en el medio para la regulación del transporte del hierro. El hierro es un oligoelemento esencial que se encuentra en el suero. Como el hierro puede ser tóxico para las células en su forma libre, en el suero se proporciona a las células unido a la transferrina, preferiblemente, en un intervalo de concentraciones entre alrededor de 0,05 a alrededor de 50 µg/ml, más preferentemente de alrededor de 5 µg/ml.
- La triyodotironina (T3) es un componente básico y es la forma activa de la hormona tiroidea que se incluye en el medio para mantener las tasas del metabolismo celular. La triyodotironina se suplementa al medio a un intervalo de concentración entre alrededor de 0 a alrededor de 400 pM, más preferentemente entre alrededor de 2 a alrededor de 200 pM y más preferentemente de alrededor de 20 pM.
- Se añade etanolamina u o-fosforiletanolamina, o ambas, que son fosfolípidos cuya función es actuar como importantes precursores en la ruta del inositol y en el metabolismo de ácidos grasos. La suplementación con lípidos que se encuentran normalmente en el suero es necesaria en un medio libre de suero. La etanolamina y la o-fosforiletanolamina se proporcionan al medio en un intervalo de concentración de entre alrededor de  $10^{-6}$  a alrededor de  $10^{-2}$  M, más preferentemente de alrededor de  $1 \times 10^{-4}$  M.
- Durante la duración del cultivo, el medio basal se suplementa adicionalmente con otros componentes, tales como hidrocortisona, selenio y L-glutamina, para inducir la síntesis o diferenciación o para mejorar el crecimiento celular.
- Se ha visto que en el cultivo de queratinocitos la hidrocortisona promueve el fenotipo de los queratinocitos y, por tanto, realiza las características diferenciadas tales como el contenido de involucrina y de transglutaminasa de los queratinocitos (Rubin y col. J. Cell Physiol, 138:208-214 (1986)). Por tanto, la hidrocortisona es un aditivo deseable en los casos donde estas características son beneficiosas tal como en el caso de la formación de injertos en láminas de queratinocitos o constructos tisulares. La hidrocortisona puede proporcionarse en un intervalo de concentraciones de entre 0,01 µg/ml a alrededor de 4,0 µg/ml, más preferentemente entre alrededor de 0,4 µg/ml a 16 µg/ml.
- El selenio se adiciona al medio libre de suero para resuplementar los oligoelementos de selenio normalmente proporcionados por el suero. El selenio puede proporcionarse en un intervalo de concentración de entre  $10^{-9}$  M hasta alrededor de  $10^{-7}$  M; más preferentemente a alrededor de  $5,3 \times 10^{-8}$  M.
- El aminoácido L-glutamina está presente en algunas bases de nutrientes y puede adicionarse en casos donde las cantidades presentes son insuficientes o inexistentes. La L-glutamina se puede proporcionar también en forma estable tal y como se vende bajo la marca GlutaMAX-1™ (Gibco BRL, Grand Island, NY). GlutaMAX-1™ es la forma estable dipeptídica de la L-alanina-L-glutamina y puede usarse de manera indistinta con L-glutamina y se proporciona en concentraciones equimolares como un sustituto de la L-glutamina. El dipéptido proporciona estabilidad a la L-glutamina contra la degradación debida al tiempo de almacenaje y durante la incubación que puede producir incertidumbre acerca de la concentración de L-glutamina efectiva en el medio. Típicamente, el medio basal se suplementa preferentemente con L-glutamina o GlutaMAX-1™ en una concentración entre alrededor de 1 mM a alrededor de 6 mM, más preferentemente alrededor de 2 mM a alrededor de 5 mM y más preferentemente 4 mM.
- Se pueden añadir al medio factores de crecimiento tal como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) para ayudar en el establecimiento de los cultivos a través del escalado de las células y la siembra. Se puede usar EGF en forma natural o recombinante. Se prefieren las formas humanas, naturales o recombinantes, de EGF para usar en el medio cuando se está fabricando un equivalente de piel que contiene componentes biológicos no humanos. El EGF es un componente opcional y puede proporcionarse a una concentración entre alrededor de 1 a 15 ng/ml, más preferentemente entre alrededor de 5 a 10 ng/ml.
- El medio anteriormente descrito se prepara típicamente como se dispone a continuación. Sin embargo, debe sobreentenderse que los componentes de la presente invención pueden prepararse y ensamblarse usando una metodología convencional compatible con sus propiedades físicas. Es bien conocido en la técnica que ciertos

componentes se pueden sustituir con un análogo apropiado o un agente actuante funcionalmente equivalente con el fin de economizar o de usar el componente más disponible y conseguir un resultado similar. Los factores de crecimiento que ocurren naturalmente pueden sustituirse con factores de crecimiento recombinantes o sintéticos que tengan cualidades y resultados similares, cuando se usan al llevar a cabo la invención.

5 Los medios de acuerdo con la presente invención son estériles. Los componentes estériles se compran estériles o se esterilizan por procedimientos convencionales, tal como filtración, después de la preparación. Procedimientos  
 10 asépticos adecuados se han utilizado a lo largo de los siguientes ejemplos. DMEM y F-12 se combinan primero y los componentes individuales se adicionan luego para completar el medio. Soluciones madre de todos los componentes pueden almacenarse a -20°C, con la excepción de la fuente de nutrientes que puede almacenarse a 4°C. Todas las  
 15 soluciones madre se preparan a las concentraciones 500x de las concentraciones finales enumeradas anteriormente. Se preparó una solución madre de insulina, transferrina y triyodotironina (todas de Sigma) tal como sigue: la triyodotironina se disuelve inicialmente en etanol absoluto en ácido clorhídrico (HCl) 1N en una proporción 2:1. La insulina se disuelve en HCl diluido (aproximadamente 0,1 N) y la transferrina se disuelve en agua. Se  
 20 mezclan luego los tres y se diluyen en agua a una concentración de 500x. La etanolamina y la o-fosforiletanolamina se disuelven en agua a una concentración de 500x y se esterilizan por filtración. La progesterona se disuelve en etanol absoluto y se diluye con agua. La hidrocortisona se disuelve en etanol absoluto y se diluye en tampón fosfato salino (PBS). El selenio se disuelve en agua en una concentración de 500x y se esteriliza por filtración. El EGF es compra estéril y se disuelve en PBS. La adenina es difícil de disolver pero puede disolverse por un número de  
 25 métodos conocidos para aquellos expertos en la materia. La albúmina sérica puede adicionarse a ciertos componentes para estabilizarlos en solución y actualmente se deriva de fuentes animales o humanas. Por ejemplo, la albúmina sérica humana (ASH) o la albúmina sérica bovina (ASB) puede adicionarse en los almacenamientos prolongados para mantener la actividad de las soluciones madre de progesterona y EGF. El medio se puede usar inmediatamente después de su preparación o se puede almacenar a 4°C. Si se almacena, el EGF no debe  
 30 adicionarse hasta el momento de su utilización.

Para formar la capa célula-matriz por el cultivo de las células productoras de la matriz, se suplementa el medio con agentes adicionales que promueven las síntesis de la matriz y la deposición por las células. Estos agentes  
 35 suplementarios con compatibles con las células, definidos a un grado elevado de pureza y libres de contaminantes. El medio usado para producir la capa de la célula-matriz se denomina "medio productor de la matriz".

Para preparar el medio productor de la matriz, el medio basal se suplementa con un derivado del ascorbato tal como ascorbato sódico, ácido ascórbico, o uno de sus derivados más estables químicamente tal como la sal magnésica n-hidratada del ácido L-ascórbico. El ascorbato se añade para promover la hidroxilación de la prolina y la secreción  
 40 del procolágeno, un precursor soluble de las moléculas de colágeno depositadas. El ascorbato ha mostrado ser un cofactor importante para el procesamiento postraduccional de otras enzimas así como un regulador positivo de la síntesis de colágeno de tipo I y tipo III.

Aunque sin querer restringirse a la teoría, la suplementación del medio con aminoácidos implicados en la síntesis  
 45 proteica conserva energía celular al no exigir que las células produzcan los aminoácidos ellas mismas. Se prefiere la adición de prolina y glicina ya que ellas, al igual que la forma hidroxilada de la prolina, la hidroxiprolina, son aminoácidos básicos que constituyen la estructura del colágeno.

Aunque no se requiere, el medio de producción de la matriz está suplementado opcionalmente con un polímero  
 50 neutro. Los constructos célula-matriz de la invención pueden producirse sin un polímero neutro, pero sin querer restringirse a la teoría de nuevo, su presencia en el medio de producción de la matriz puede hacer más uniforme entre muestras el procesamiento de colágeno y la deposición. Un polímero neutro preferido es el polietilenglicol (PEG), que ha mostrado que promueve el procesamiento *in vitro* del precursor soluble procolágeno producido por las  
 55 células cultivadas en el colágeno depositado en la matriz. PEG de grado de cultivo tisular, en un intervalo entre alrededor 1000 y alrededor de 4000 PM (peso molecular), más preferentemente, en el medio de la invención, se prefiere entre alrededor 3400 y alrededor de 3700 PM. Las concentraciones preferidas de PEG para utilizar en el método pueden ser concentraciones de alrededor del 5% p/v o menos, preferentemente de alrededor del 0,01% p/v a alrededor del 0,5% p/v, más preferentemente entre alrededor del 0,025% p/v y alrededor del 0,2% p/v, más preferentemente alrededor del 0,05% p/v. Otros polímeros neutros de grado de cultivo tales como dextrano, preferiblemente T-40 dextrano o polivinilpirrolidona (PVP), preferentemente en el intervalo de 30.000-40.000 PM, también pueden usarse a concentraciones de alrededor del 5% p/v o menos, preferentemente entre alrededor del 0,01 % p/v y alrededor del 0,5 % p/v, más preferentemente entre alrededor del 0,025% p/v y alrededor del 0,2 % p/v, más preferentemente alrededor del 0,05 % p/v. Otros agentes de grado de cultivo celular y compatibles con las  
 60 células que mejoran el procesamiento del colágeno y la deposición pueden determinarse por el técnico con experiencia en la técnica del cultivo de células de mamífero.

Cuando las células productoras de células son confluentes y el medio de cultivo se suplementa con componentes que asisten en la síntesis de la matriz, secreción u organización, se dice que se estimulan las células para formar un constructo tisular que comprende células y matriz sintetizadas por esas células.

Por tanto, una formulación preferida para el medio de producción de la matriz comprende: una mezcla basal 3:1 del medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (formulación con alta glucosa, sin L-glutamina) y el medio Hams F-12 suplementado con L-glutamina 4 mM o un equivalente, 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 0,4 µg/ml de hidrocortisona,  $1 \times 10^{-4}$  M de etanolamina,  $1 \times 10^{-4}$  M de o-fosforiletanolamina, 5 µg/ml de insulina, 5 µg/ml de transferrina, triyodotironina 20 pM, 6,78 ng/ml de selenio, 50 ng/ml de ácido L-ascórbico, 0,2 µg/ml de L-prolina y 0,1 µg/ml de glicina. Al medio de producción se pueden añadir otros agentes farmacológicos al cultivo para alterar la naturaleza, cantidad o tipo de la matriz extracelular secretada. Estos agentes pueden incluir factores de crecimiento polipeptídicos, factores de transcripción o sales inorgánicas para regular de manera positiva la transcripción del colágeno. Ejemplos de factores de crecimiento polipeptídicos incluyen el factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF-β1) y el activador tisular del plasminógeno (TPA), ambos de los cuales se sabe que regulan de manera positiva la síntesis de colágeno. Raghov et al., *Journal of Clinical Investigation*, 79:1285-1288 (1987); Pardes et al., *Journal of Investigative Dermatology*, 100:549 (1993). Un ejemplo de una sal inorgánica que estimula la producción de colágeno es el cerio. Shivakumar et al., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 24:775-780 (1992).

Los cultivos se mantienen en un incubador para asegurar condiciones ambientales suficientes de temperatura, humedad y mezcla de gases controlados para el cultivo de las células. Las condiciones preferidas están en una temperatura entre alrededor de 34 °C y alrededor de 38 °C, más preferentemente  $37 \pm 1$  °C con una atmósfera entre alrededor de  $5-10 \pm 1$  % de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa (HR) entre alrededor de 80-90 %.

En la realización preferida, el constructo célula-matriz es un constructo dérmico formado de fibroblastos dérmicos y su matriz secretada. Preferentemente, se usan fibroblastos dérmicos humanos, derivados como células primarias de la dermis o más preferentemente de pases en serie o subcultivadas de reservas o bancos de células establecidos que han sido examinados para detectar una posible contaminación vírica y bacteriana y ensayados para conocer su pureza. Las células se cultivan bajo condiciones suficientes en medio de crecimiento para hacer que proliferen hasta un número apropiado para sembrar las células en el sustrato del cultivo en el cual formen un constructo célula-matriz. Como alternativa, las células de un cultivo madre de células congelados pueden sembrarse directamente en el sustrato del cultivo.

Una vez que se hayan obtenido números de células suficientes, se toman las células y se siembran en una superficie de cultivo adecuada y se cultivan bajo condiciones de crecimiento apropiadas para formar una lámina de células confluentes. En la realización preferida, las células se siembran en una membrana porosa que se sumerge para permitir el contacto con el medio desde debajo del cultivo a través de los poros y directamente arriba. Preferentemente, se suspenden las células en medio de crecimiento o de base y se siembran en la superficie del cultivo celular a una densidad entre alrededor de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y alrededor de  $6,6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, más preferentemente entre alrededor de  $3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y al alrededor de  $6,6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> y aún más preferentemente alrededor de  $6,6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> (células por un área de la superficie de un centímetro cuadrado). Los cultivos se cultivan en medio de crecimiento para establecer el cultivo y son cultivados hasta una confluencia de entre alrededor del 80% y el 100%, momento en el que se los induce químicamente, cambiando el medio a medio de producción de la matriz, para regular de forma positiva la síntesis y secreción de la matriz extracelular. En un método alternativo, las células se siembran directamente en el medio de producción para eliminar la necesidad de cambiar del medio básico al medio de producción pero ese es un método que requiere mayores densidades de sembrado.

Durante el cultivo, los fibroblastos organizan las moléculas matriciales secretadas para formar una estructura similar al tejido tridimensional pero no muestran fuerzas contráctiles significativas para hacer que el constructo célula-matriz que se está construyendo se contraiga y se pele del sustrato de cultivo. Se hacen cambios de medio cada dos o tres días con medio de producción de matriz fresco y con el tiempo, la matriz secretada incrementa su grosor y organización. El tiempo necesario para crear un constructo célula-matriz depende de la habilidad de la densidad de sembrado inicial, el tipo de célula, la edad de la línea celular y la habilidad de la línea celular para sintetizar y secretar la matriz. Cuando están totalmente formados, los constructos de la invención tienen un grosor voluminoso debido a la matriz fibrosa producida y organizada por las células; no son ordinariamente confluentes o cultivos celulares demasiado confluentes donde las células pueden estar adheridas unas a otras de forma débil. La calidad fibrosa da a los constructos propiedades cohesivas similares a las del tejido, a diferencia de los cultivos ordinarios, porque pueden resistir el daño físico, tal como el desgarrar o el agrietamiento, de la manipulación rutinaria en un marco clínico. En la fabricación de un constructo dérmico cultivado, las células formarán una matriz organizada alrededor de ellas mismas en la superficie del cultivo celular, preferentemente con un grosor de al menos 30 micrones o más, más preferentemente un grosor a través de la superficie de la membrana de entre alrededor 60 y alrededor de 120 micrones; sin embargo, se han obtenido grosores superiores a los 120 micrones y son adecuados para usar en aplicaciones clínicas o de ensayo donde se necesitan tales mayores grosores.

En un método preferido, una capa de células epiteliales se aplica a una superficie, preferentemente la superior, la superficie que mira hacia arriba del constructo célula-matriz. Para el constructo célula-matriz, las células epiteliales se pueden sembrar y cultivar sobre él para formar un constructo tisular multicapa. En el método más preferido, se cultivan los queratinocitos derivados de la piel en el constructo celular para formar un constructo de piel. En otras realizaciones preferidas, las células del epitelio corneal, también denominadas queratinocitos de la córnea, pueden

sembrarse en el constructo célula-matriz para formar un constructo corneal. Las células epiteliales de la mucosa oral pueden cultivarse en el constructo célula-matriz para formar un constructo de mucosa oral. Células epiteliales del esófago pueden sembrarse en el constructo célula-matriz para formar un constructo de tejido esofágico. Células uroepiteliales del tracto genitourinario pueden sembrarse en el constructo célula-matriz para formar un constructo de uroepitelio. Pueden seleccionarse otras células de origen epitelial para formar un constructo del tejido del cual esas células se derivan.

Se conocen en la técnica métodos para proporcionar células epidérmicas para un sustrato dérmico, y métodos para su cultivo, incluyendo la inducción de la diferenciación y cornificación para formar una capa de queratinocitos diferenciada y se describen en la patente de los EE. UU. número 5.712.163 de Parenteau et al. y en la patente de los EE. UU. número 5.536.656 de Kemp et al., los contenidos de las cuales se incorporan aquí por referencia. Típicamente, para llevar a cabo la epidermalización del constructo célula-matriz, se siembran los queratinocitos en el constructo célula-matriz y se cultivan sobre el mismo hasta que la capa tiene un grosor de alrededor de una a tres capas de células. Se inducen luego los queratinocitos para que diferencien formando una epidermis multicapa y se inducen entonces para que se cornifiquen para que formen un estrato córneo.

En el método para formar una capa epidérmica diferenciada, se toman queratinocitos subcultivados de cultivos madre de células y se expanden sus números de células. Cuando se obtiene un número necesario de células, se liberan del sustrato del cultivo, se suspenden, cuentan, diluyen y entonces se siembran en la superficie superior del constructo célula-matriz a una densidad entre alrededor de  $4,5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> y alrededor de  $5,0 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, más preferentemente entre alrededor de  $1,0 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> y alrededor de  $1,0 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>, y más preferentemente a alrededor de  $4,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Los constructos se incuban luego durante un intervalo de entre aproximadamente 60 y 90 minutos a  $37 \pm 1$  °C, 10% CO<sub>2</sub> para permitir a los queratinocitos adherirse. Después de la incubación, los constructos se sumergen en medio de epidermalización. Después de un intervalo de tiempo suficiente en el cultivo, los queratinocitos proliferan y se extienden para formar una monocapa confluyente a lo largo del constructo célula-matriz. Una vez en confluencia, la formulación del medio celular se cambia a medio de diferenciación para inducir la diferenciación celular. Cuando el epitelio multicapa se ha formado, se usa entonces medio de cornificación y se trae el cultivo a la interfaz aire-líquido. Para la diferenciación y la cornificación de los queratinocitos, las células se exponen a una interfaz aire-líquido seca o con poca humedad. Se puede caracterizar una interfaz seca o con poca humedad como la que duplica los niveles bajos de humedad de la piel. Con el tiempo, los queratinocitos expresarán todas o la mayor parte de las queratinas y otras características que se encuentran en la piel natural cuando se expone a estas condiciones.

Como se menciona anteriormente, el sistema para la producción de un constructo célula-matriz puede usarse en la formación de un constructo corneal. Las células de la córnea epitelial pueden derivarse de una variedad de fuentes mamíferas. La célula epitelial preferida es una célula de córnea epitelial humana o de conejo (queratinocito córneo) pero puede usarse cualquier queratinocito córneo de mamíferos. Otros queratinocitos epiteliales como los derivados de la esclerótica (porción opaca blanca exterior) del ojo o de la epidermis pueden sustituirse, pero se prefieren queratinocitos córneos. En el método para formar un constructo córneo, se separa el medio del inserto del cultivo (que contiene el constructo célula-matriz) y el entorno. Células de la córnea epitelial de conejo normales se expanden mediante subcultivos, se tripsinizan para separarlas del sustrato de cultivos, se suspenden en medio de cultivo y se siembran en la superficie superior de la membrana con una densidad de entre  $7,2 \times 10^4$  y alrededor de  $1,4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Los constructos se incuban posteriormente sin medio durante alrededor de cuatro horas a  $37 \pm 1$  °C, 10 % CO<sub>2</sub> para permitir a las células epiteliales adherirse. Después de la incubación, los constructos se sumergen en medio de mantenimiento corneal (CMM) (Johnson et al., 1992). Las células epiteliales se cultivan hasta que el constructo célula-matriz se cubre con las células epiteliales. La compleción de la cobertura epitelial se puede determinar por una variedad de métodos, para ilustrar mediante la tinción del cultivo con una solución de sulfato azul de nilo (1:10.000 en una solución salina tamponada de fostato). Una vez que se cubre el constructo célula-matriz, después de aproximadamente siete días, los constructos son transferidos asépticamente a nuevas bandejas de cultivo con suficiente medio de mantenimiento de la córnea (CMM) para alcanzar un nivel fluido suficiente para que la superficie del constructo mantenga una interfaz húmeda sin sumergir la capa epitelial. Los constructos se incuban a  $37 \pm 1$  °C, 10% CO<sub>2</sub> y una humedad mayor del 60% en CMM, cambiando el medio según se necesite, típicamente, tres veces por semana.

Para la diferenciación, pero no la cornificación de la capa de células epiteliales, como se necesita en la producción de un constructo corneal, la superficie celular corneal se expone a una interfaz húmeda aire-líquido. Se describen métodos para proporcionar una interfaz húmeda aire-líquido en la patente de los EE. UU. número 5.374.515 de Parenteau. Según se usa aquí, el término "interfaz húmeda" quiere significar un ambiente de cultivo que está regulado de modo que la superficie del constructo está húmeda, con una humedad elevada, pero no seca o sumergida. El nivel exacto de humedad en el ambiente de cultivo no es crítico, pero debe ser lo suficientemente húmedo para evitar la formación de células cornificadas. Una interfaz húmeda puede caracterizarse como la que intenta duplicar niveles de humedad similares a los del ojo humano.

En una realización alternativa preferida, se puede llevar a cabo el sembrado de una segunda célula productora de la matriz sobre un constructo célula-matriz formado en primer lugar para obtener un constructo célula-matriz más

grueso o un constructo célula-matriz bicapa. La segunda siembra se puede llevar a cabo con el mismo tipo celular o cepa o con un diferente tipo celular o cepa, dependiendo del resultado deseado. La segunda siembra se lleva a cabo bajo las mismas condiciones empleando los procedimientos y el medio de la producción de la matriz usados en la producción de la primera capa. Un resultado de llevar a cabo la segunda siembra con un tipo celular diferente es que se obtiene una matriz formada con diferentes perfiles de componentes matriciales o densidad de empaquetamiento matricial que afectará la cicatrización de la herida cuando el constructo se injerta en el paciente. La primera siembra celular produce un análogo matricial de la capa reticular de la dermis, una capa de colágeno tipo I empaquetada más densamente y componentes matriciales extracelulares constituyentes. La segunda siembra de células podría producir una matriz similar a la capa de las papilas de la dermis caracterizada por fibrillas de colágeno más flojas y a la matriz extracelular. Otro resultado es que el segundo tipo celular pueda producir una sustancia terapéutica que podría afectar también la cicatrización de la herida, tal como una mejor incorporación o integración del injerto o la minimización o prevención de la formación de cicatrices.

En otra realización preferida, poblaciones de células mixtas de dos o más tipos celulares pueden cultivarse juntas durante la formación de un constructo célula-matriz siempre y cuando al menos uno de los tipos celulares sea capaz de sintetizar una matriz extracelular. El segundo tipo celular puede necesitarse para llevar a cabo otras funciones tisulares o para desarrollar características estructurales particulares del constructo tisular. Por ejemplo, en la producción de un constructo tisular, las células de la papila dérmica o las células epiteliales anexas pueden cultivarse con las células productoras de la matriz para permitir la formación de apéndices epiteliales o sus componentes. Los apéndices dérmicos tales como las estructuras o componentes de las glándulas sebáceas o sudoríparas o estructuras o componentes del folículo piloso pueden formarse cuando se cultivan junto con las células productoras de la matriz. Las células epiteliales pueden derivarse de estructuras de apéndices de una glándula o pelo situadas en la dermis profunda, tal como por microdissección, e incluir células ecrinas, células mioepiteliales, células secretoras glandulares, células madre del folículo capilar. Otros tipos de células que se encuentran normalmente en la piel que constituyen la piel también se pueden añadir tales como melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. De forma similar, las células de endotelio vascular pueden cocultivarse para producir componentes rudimentarios para la formación de vascularización nueva. Los adipocitos también se pueden cultivar con las células productoras de la matriz para formar un constructo usado en la cirugía reconstructiva. Como un modo alternativo de liberación de este segundo tipo celular, las células pueden sembrarse localizadas en un punto o como una disposición de un número cualquiera de puntos de células sobre o dentro de una matriz célula-tejido totalmente formada o en proceso de formación para un desarrollo localizado de estas estructuras. Para sembrar las células en el constructo célula-matriz, las células pueden inyectarse entre las superficies superior e inferior, dentro de la célula-matriz, para que las células crezcan, formen estructuras especializadas y realicen su función especializada.

Para producir un constructo tisular de tres capas, una primera siembra de células que comprende un tipo celular productor de la matriz o un tipo celular no productor de la matriz se siembra en el sustrato del cultivo durante un tiempo suficiente para producir un constructo célula-matriz o una capa celular. Una vez que se forma el primer constructo célula-matriz o la primera capa celular, se realiza una segunda siembra de células que comprenden un tipo celular productor de la matriz en la superficie superior del primer constructo célula-matriz o capa celular y se cultiva por un tiempo bajo condiciones suficientes para formar un segundo constructo célula-matriz sobre el primer constructo. En el segundo constructo célula-matriz, se lleva a cabo una tercera siembra de un tercer tipo celular y se cultiva bajo condiciones suficientes para producir una tercera capa. Como ejemplo, para producir un constructo córneo de tres capas, la célula del primer tipo celular puede comprender un origen endotelial, tal como células endoteliales córneas; el segundo tipo celular puede comprender células con origen en tejido conjuntivo, tal como los queratinocitos córneos; y el tercer tipo celular puede comprender células de origen epitelial, tal como células del epitelio corneal. Como otro ejemplo de un constructo de piel de tres capas, las células de la primera siembra pueden tener origen vascular para proporcionar los componentes para la vascularización, las células de la segunda siembra pueden comprender fibroblastos dérmicos para formar un constructo célula-matriz que sirva como un constructo dérmico, y las células de la tercera siembra pueden ser queratinocitos epidérmicos para formar una capa epidérmica.

Los constructos tisulares de la invención pueden almacenarse a temperaturas criogénicas cuando se emplean métodos de vitrificación o criopreservación. Se describen métodos para la vitrificación de constructos tisulares en la patente de los EE. UU. número 5.518.878 y se describen métodos para la criopreservación en las patentes de los EE. UU. números 5.689.961 y 5.891.617 y una solicitud internacional PCT WO 96/24018, las descripciones de las cuales se incorporan aquí por referencia.

Los constructos de piel de esta invención se pueden usar en sistemas de ensayos tisulares para ensayos toxicológicos *in vitro*. Los sistemas de ensayo que incorporan constructos de piel con fines de ensayo se describen en la patente de los EE. UU. número 4.835.102, cuya descripción se incorpora aquí por referencia. Dado que el constructo de piel producido por las células tiene una estructura similar y, más importantemente, una organización similar a la de la piel, puede ser un sistema de ensayo valioso como alternativa o sustituyente de ensayos de absorción, toxicidad y, en muchos casos, efectividad de los productos, que se llevan a cabo en seres humanos o animales vivos. Se ha visto que la producción de la matriz imita varios de los procesos mostrados en la producción

de la matriz así como la reparación de la matriz *in vivo*. Por esta razón, el sistema descrito puede ser una herramienta valiosa para el análisis de la reparación de la herida y la generación de tejido y además para el ensayo y análisis de estimulantes químicos y/o físicos de la reparación de la herida.

5 El uso más preferido para los constructos de piel de esta invención es el injerto o la implantación en un receptor mamífero para restaurar o reparar la piel dañada debido a una herida o una enfermedad. Las indicaciones para injertar un constructo de piel incluyen, pero no se limitan a, la cirugía plástica o reconstructiva, heridas de la piel, quemaduras, psoriasis, úlceras diabéticas y venosas y células basales de carcinoma. Los constructos de piel de la invención son útiles tanto para proteger el tejido herido como para servir como un andamio para el crecimiento hacia  
10 adentro del tejido del receptor. Se cree que el nivel de organización del tejido producido en esta invención también sirve para facilitar y posiblemente acelerar las acciones de reparación de la herida.

Los constructos célula-matriz de la invención tienen propiedades cohesivas. "Cohesivo" se usa aquí con el significado de ser capaz de mantener la integridad física unitaria y las propiedades de manejo similares a las del  
15 tejido. Las propiedades físicas que primeramente dan a los constructos de la invención las propiedades cohesivas son el grosor voluminoso y la estructura fibrosa de la matriz. La matriz fibrosa extracelular se forma a partir de colágeno sintetizado por las células y otros componentes matriciales, principalmente colágeno fibrilar dispuesto en fibrillas y haces de fibrillas y le da al constructo su volumen. Los constructos célula-matriz de la invención son manejables, es decir, pueden pelarse manualmente de su sustrato de cultivo, sin el soporte de un transportador o de  
20 herramientas especializadas, y aplicarse al paciente o al aparato de ensayo. Puede ser resistente al daño tal como el desgarramiento o el estiramiento de la manipulación ordinaria en la clínica sin detrimento de la estructura o función. Cuando se aplica al paciente, pueden asegurarse en el lugar con grapas o puntos.

Para injertar en un paciente el constructo de piel de la presente invención, el área del injerto se prepara de acuerdo  
25 con la práctica estándar. Para quemaduras, los sitios de heridas de quemaduras que van a recibir los injertos han de prepararse para el injerto de modo que el área de piel quemada se extirpe totalmente. Las áreas desbridadas aparecerán limpias y clínicamente no infectadas antes del injerto. Para heridas profundas de espesor parcial debidas a la extirpación quirúrgica, el área preoperativa se afeita, si es necesario, se limpia con un limpiador de piel antiséptico y antimicrobiano y se enjuaga con solución salina normal. La anestesia local normalmente consiste en una administración intradérmica de lidocaína o epinefrina o ambas. Una vez que se ha logrado la anestesia, se usa un dermatomo para retirar la piel a una profundidad apropiada, creando una herida profunda de espesor parcial. Se puede conseguir la homeostasis por compresión con epinefrina que contiene lidocaína y por electrocauterización. Se aplica entonces el constructo de piel al lecho de la herida y, si se necesita, se asegura en el lugar por sutura o con  
30 grapas, luego se refuerza y se venda con vendajes apropiados.

Los constructos de piel de la presente invención también pueden transformarse en una malla antes del injerto en el  
35 paciente. Este proceso mejora la conformación del constructo de piel para el lecho de la herida y proporciona una manera de drenar el exudado de la herida desde debajo del implante. El término mallado (transformación en una malla) se define como un método mecánico por el cual se perfora un tejido con hendiduras para dar lugar a una disposición tipo red. El mallado se obtiene preferentemente usando un mallador de piel convencional (ZIMMER®; BIOPLASTY®). También se puede rayar o perforar un tejido manualmente con un escalpelo o una aguja. La piel  
40 mallada o retiforme puede expandirse estirando la piel para que se abran las hendiduras y se aplique entonces al lecho de la herida. El tejido retiforme extendido proporciona una cobertura máxima al área de la herida. Como alternativa, la piel retiforme se puede aplicar sin expansión, simplemente como una lámina con una disposición de hendiduras no expandidas. El constructo de piel retiforme se puede aplicar sólo o con la propia piel del paciente de otra área de su cuerpo. Los constructos tisulares pueden también tener perforaciones o ventanajes y poros realizados por otros medios. Los ventanajes también pueden aplicarse manualmente usando un láser, un punzón, un  
45 escalpelo, una aguja o un afiler.

50 Los constructos de piel de la invención pueden aplicarse a otras heridas aparte de las heridas quirúrgicas o quemaduras. Otras heridas tales como úlceras venosas, úlceras diabéticas, úlceras por presión, pueden experimentar un beneficio en la cicatrización al aplicar el constructo de piel presentado. Otras enfermedades de la piel congénitas tales como la epidermólisis bullosa pueden también puede beneficiarse.

55 Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mayor explicación de la práctica de la presente invención y no deben interpretarse en ningún caso como una limitación del ámbito de la presente invención. Aquellos expertos en la técnica reconocerán las diferentes modificaciones que pueden hacerse a los métodos aquí descritos sin que eso suponga un desvío de la intención y ámbito de la presente invención.

## 60 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Formación de una matriz de colágeno por fibroblastos de prepucio de seres humanos neonatos

65 Los fibroblastos de prepucio de seres humanos neonatos (originados en Organogenesis, Inc. Canton, MA) se sembraron en un matraz tratado a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ matraz tratado para cultivo tisular de 162

5 cm<sup>2</sup> (Costar Corp., Cambridge, MA, cat # 3150) y crecidas en medio de cultivo. El medio de crecimiento consistió de: medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (formulación con alta glucosa, sin L-glutamina, BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado con un 10% de suero de ternera recién nacida (NBCS) (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) y L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD). Las células se mantuvieron en un incubador a 37 ± 1°C con una atmósfera de 10 ± 1% de CO<sub>2</sub>. El medio fue reemplazado con medio recién preparado cada dos o tres días. Después de 8 días en cultivo, las células habían crecido hasta alcanzar la confluencia, esto es, las células habían formado una monocapa empaquetada a lo largo del fondo del matraz de cultivo del tejido y se aspiró el medio del matraz de cultivo. Para lavar la monocapa, se adicionó una solución salina de tampón fosfato y esterilizada por filtración al fondo de cada matraz de cultivo y se aspiró entonces de los matraces. Las células se liberaron del matraz por adición de 5 ml de glutamina y tripsina-verseno (BioWhittaker, Walkersville, MD) a cada matraz y agitándolo suavemente para asegurar una cobertura completa de la monocapa. Los cultivos se devolvieron al incubador. Tan pronto como se liberaron las células, se añadieron 5 ml de SBTI (inhibidor de tripsina de la soja) a cada matraz y se mezclaron con la suspensión para parar la acción de la tripsina-versano. La suspensión celular se retiró de los matraces y se dividió equitativamente en tubos de centrifugación cónica estériles. Se recogieron las células por centrifugación a aproximadamente 8000-1000 x g durante 5 minutos.

20 Se resuspendieron las células usando medio fresco a una concentración de 3,0 x 10<sup>6</sup> células/ml, y se sembraron en insertos de cultivo tisular tratados de 24 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,4 micrones (TRANSWELL®, Coming Costar) en una bandeja de seis pozos a una densidad de 3,0 x 10<sup>6</sup> células/inserto (6,6 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>). Las células se mantuvieron en un incubador a 37 ± 1 °C con una atmósfera de 10 ± 1 % de CO<sub>2</sub> y se nutrieron con medio de producción fresco cada 2 ó 3 días durante 21 días. El medio de producción comprende: una mezcla basal 3:1 de los medios DMEM y Hams F-12 (Quality Biologics Gaithersburg, MD), GlutaMAX-1™ 4 mM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y aditivos hasta alcanzar una concentración de: 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (Upstate Biotechnology Lake Placid, NY), 2% de suero de ternero recién nacido (Hyclone, Logan, Utah), 0.4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina 1 x 10<sup>-4</sup> M (Fluka, Ronkonkoma, NY grado ACS), o-fosforiletanolamina 1 x 10<sup>-4</sup> M (Sigma, San Luis), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO) y 6.78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI), 50 ng/ml de ácido L-ascórbico (WAKO Chemicals EE. UU., Inc. # 013-12061), 0,2 µg/ml de L-prolina (Sigma, San Luis, MO), 0,1 µg/ml de glicina (Sigma, San Luis, MO) y un 0,05% de polietilenglicol (PEG) de un PM 3400-3700 (Sigma, San Luis, MO).

35 Las muestras para los análisis histológicos se tomaron en los días 7, 14 y 21 y fijadas en formalina, embebidas entonces en parafina. Las muestras fijadas en formalina se embebieron en parafina y una sección de 5 micrómetros se tiñó con hematoxilina-eosina (H&E) de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. Utilizando los portaobjetos teñidos con H&E, se hicieron medidas del grosor a diez campos microscópicos elegidos al azar usando un visor 10X equipado con un retículo de 10 mm/100 micrómetros.

40 En la tabla 1 se resumen los resultados de dos cepas celulares de fibroblastos dérmicos humanos, la cual muestra el grosor del constructo célula-matriz según se desarrolla.

Tabla 1:

Grosor (micrones)				
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
B119 Media (n=3)	0	30,33 ± 2,61	63,33 ± 4,40	84,00 ± 4,67
B156 Media (n=4)	0	42,00 ± 5,14	63,85 ± 4,50	76,25 ± 8,84

45 Las muestras también se sometieron a análisis de la concentración de colágeno en los días 7, 14 y 21. El contenido de colágeno se estimó empleando un ensayo colorimétrico para el contenido de hidroxiprolina conocido en la técnica (Woessner, 1961). En esos mismos momentos se determinó también el número de células. La tabla 2 es un resumen de las concentraciones de colágeno y la tabla 3 es un resumen de los datos de las células de los constructos célula-matriz producidos a partir de dos cepas celulares diferentes (B156 y B119) usando el procedimiento descrito anteriormente.

50

Tabla 2:

Colágeno (µg/cm <sup>2</sup> )				
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
B119 Media (n=3)	0	93,69 ± 22,73	241,66 ± 21,08	396,30 ± 29,38
B156 Media (n=3)	0	107,14 ± 17,16	301,93 ± 23,91	457,51 ± 25,00

Tabla 3:

Células (células/cm <sup>2</sup> )				
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
B 119 Media (n=3)	6,6 x 10 <sup>5</sup>	11,8 ± 4,4 x 10 <sup>5</sup>	11,4 ± 1,7 x 10 <sup>5</sup>	13,9 ± 1,2 x 10 <sup>5</sup>
B 156 Media (n=3)	6,6 x 10 <sup>5</sup>	13,1 ± 0,5 x 10 <sup>5</sup>	14,0 ± 2,1 x 10 <sup>5</sup>	17,1 ± 1,7 x 10 <sup>5</sup>

5 Se analizaron muestras de la matriz dérmica derivada de células humanas tomadas los días 7, 14 y 21 por SDS-PAGE en condiciones reductoras retardadas para determinar la composición de colágeno que revelaron las bandas alfa de colágeno tipo I y tipo III en las muestras.

10 Se determinaron las características bioquímicas de la matriz dérmica utilizando métodos inmunohistoquímicos. La identificación de fibronectina se llevó a cabo en secciones fijadas en parafina usando el sistema estreptavidina-biotina Histostain de Zymed (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA). Se determinó la presencia de tenascina por la tinción del anticuerpo primario anti-tenascina (Dako, Carpinteria, CA) seguido por el anticuerpo contra anticuerpo de ratón marcado con peroxidasa de rábano picante (Calbiochem) como anticuerpo secundario.  
15 Se visualizaron las muestras por aplicación de diaminobencino (Sigma San Luis, MO) y contratinción con rojo nuclear rápido.

20 La cuantificación de glicosaminoglicano (GAG) se llevó a cabo en muestras tomadas el día 21 usando el método descrito anteriormente (Farndale, 1986). El ensayo mostró la presencia de 0,44 gramos de GAG por cm<sup>2</sup> en una muestra de matriz dérmica derivada de células humanas tomada 21 días después de la siembra.

#### Ejemplo 2: Constructos de piel de espesor total

25 Usando un constructo dérmico formado mediante el método descrito en el ejemplo 1, se depositaron queratinocitos epidérmicos de piel de prepucio de neonatos humanos normales (originados en Organogenesis, Inc. Canton, MA) sobre el constructo célula-matriz para formar la capa epidérmica del constructo de piel.

30 Se separó asépticamente el medio del inserto del cultivo y del entorno. Se escalaron queratinocitos epidérmicos humanos normales hasta el cuarto pase desde un subcultivo madre de células congeladas hasta llegar a la confluencia. Se liberaron entonces las células de las placas de cultivo usando tripsina-versano, se acumularon y centrifugaron para formar un sedimento celular, se resuspendió en medio de epidermalización, se contaron y sembraron en la superficie de la membrana a una densidad de 4,5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Los constructos se incubaron entonces durante 90 minutos a 37 ± 1°C, 10 % de CO<sub>2</sub> para permitir la adhesión de los queratinocitos. Tras la incubación, los constructos se sumergieron en medio de epidermalización. El medio de epidermalización está  
35 compuesto de una mezcla base 3:1 del medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (formulación con elevada cantidad de glucosa, sin L-glutamina (BioWhittaker, Walkersville, MD) y el medio Hams F-12 (Quality Biologics Gaithersburg, MD), suplementado con 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma San Luis, MO), etanolamina 1 x 10<sup>-4</sup> M (Fluka, Ronkonkoma, NY), O-fosforiletanolamina 1 x 10<sup>-4</sup> M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO), 6,78 ng/ml  
40 de selenio (Aldrich), 24,4 µg/ml de adenina (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD), suero de ternera recién nacida quelado al 0,3% (Hyclone, Logan, Utah), 0,628 ng/ml de progesterona (Amersham Arlington Heights, IL), 50 µg/ml de la sal sódica del ácido L-ascórbico (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (Life Technologies Inc., MD) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Amersham, Arlington Heights, IL). Los constructos se cultivaron en  
45 medio de epidermalización durante 2 días a 37 ± 1 °C, 10 % de CO<sub>2</sub>.

Después de dos días se sumergió el constructo en medio compuesto de una mezcla 3:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (formulación con una elevada cantidad de glucosa, sin L-glutamina, BioWhittaker, Walkersville, MD) y medio Hams F-12 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD), suplementado con 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina 1 x 10<sup>-4</sup> (Fluka, Ronkonkoma, NY), O-fosforiletanolamina 1 x 10<sup>-4</sup>  
50 M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO) y 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), 24,4 µg/ml de adenina (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company), L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD), suero de ternera recién nacida quelado al 0,3 % (BioWhittaker, Walkersville, MD), 0,628 ng/ml de progesterona (Amersham, Arlington Heights, IL), 50 µg/ml de ascorbato sódico, 265 µg/ml de cloruro cálcico (Mallinckrodt, Chesterfield, MO) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Amersham, Arlington Heights, IL). De nuevo, se incubo el constructo a 37 ± 1 °C, 10 % de CO<sub>2</sub> durante 2 días.  
55

Después de dos días, el portador que contenía el constructo se transfirió asépticamente a nuevas bandejas de

cultivo con una cantidad suficiente de medio de cornificación, 9 ml, para conseguir un nivel fluido justo hasta la superficie de la membrana del portador para mantener una interfaz seca que permita la estratificación de la capa epitelial. Los constructos se incubaron a  $37 \pm 1$  °C, 10% de CO<sub>2</sub> y baja humedad, en medio con cambios de medio cada 2-3 días durante 7 días. Este medio está compuesto de una mezcla 1:1 del medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (formulación con elevada cantidad de glucosa, sin L-glutamina BioWhittaker, Walkersville, MD) y medio Hams F-12 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD), suplementado con 0.4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY), O-fosforiletanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO), 6,78 ng/ml de selenio (Aldrich), 24,4 µg/ml de adenina (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company), L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD), suero de ternero recién nacido al 2% (BioWhittaker, Walkersville, MD), 50 µg/ml de ascorbato sódico y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Amersham, Arlington Heights, IL). Después de 7 días el constructo se nutrió durante 10 días más, con cambios cada 2-3 días usando un medio de mantenimiento. Este medio de mantenimiento estaba compuesto de una mezcla 1:1 del medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (formulación con una cantidad elevada de glucosa, sin L-glutamina, BioWhittaker, Walkersville, MD) y medio Hams F-12 (Quality Biologics Gaithersburg, MD), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY), O-fosforiletanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO) y 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), 24,4 µg/ml de adenina (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD), suero de ternero recién nacido al 1% (BioWhittaker, Walkersville, MD) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Amersham, Arlington Heights, IL).

Las muestras finales se sometieron al proceso de hematoxilina y eosina descrito en el ejemplo 1 para determinar la apariencia física bajo microscopía óptica. El constructo resultante consistió en una capa inferior (dérmica) compuesta de fibroblastos rodeados por una matriz con las características descritas en el ejemplo 1, y se cubrió totalmente por una capa múltiple de queratinocitos bien diferenciados estratificada que muestra una capa basal, una capa suprabasal, una capa granulada y un estrato córneo similar al de la piel *in situ*. El constructo de piel tiene una membrana en la base bien desarrollada presente en la unión de la dermis con la epidermis tal como muestra la microscopía electrónica de transmisión (MET). La membrana de la base muestra su mayor grosor alrededor de los hemidesmosomas, marcados por fibrillas de anclaje compuestas de colágeno de tipo VII, tal como se ve por MET. Como se esperaba esas fibrillas de anclaje pueden verse fácilmente saliendo de la membrana de la base y atrapando las fibrillas de colágeno. La presencia de la laminina, una glicoproteína de la membrana basal, se mostró usando la técnica inmunoenzimática de la avidina-biotina previamente descrita (Guesdon, 1979).

Ejemplo 3: Formación *in vitro* de una matriz de colágeno por fibroblastos de prepucio de neonatos humanos en un medio químicamente definido

Los fibroblastos de prepucio de neonatos humanos se expandieron usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Las células se resuspendieron posteriormente a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml, y se sembraron en insertos de membrana de cultivo tisular tratados de 24 mm de diámetro y con un tamaño de poro de 0,4 micrones, en una bandeja de seis pocillos a una densidad de  $3,0 \times 10^6$  células/TW ( $6,6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>). Estas células se mantuvieron luego como en el ejemplo 1 pero eliminando el suero de ternero recién nacido del suero usado en todo el experimento. Más específicamente, el medio contenía una mezcla base 3:1 de DMEM y medio Hams F-12 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD), GlutaMAX 4 mM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y aditivos: 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY cat. #02400 grado ACS), O-fosforiletanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO) y 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), 50 ng/ml de ácido L-ascórbico (WAKO Chemicals EE. UU., Inc.), 0,2 µg/ml de L-prolina (Sigma, San Luis, MO), 0,1 µg/ml de glicina (Sigma, San Luis, MO) y polietilenglicol (PEG) al 0,05 % (Sigma San Luis, MO). Las muestras se revisaron los días 7, 14 y 21 para determinar la concentración de colágeno y el número de células usando los procedimientos descritos. Los resultados se resumen en las tablas 4 (número de células) y 5 (colágeno). Las muestras también se fijaron en formalina y se procesaron para la tinción con hematoxilina y eosina para el análisis con microscopio óptico según se describe en el ejemplo 1. La evaluación histológica demostró que los constructos crecidos en medio definido eran similares a los crecidos en presencia de suero de ternero recién nacido al 2 %. Las muestras también dieron positivo en el ensayo de tinción para fibronectina, usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

Tabla 4:

Colágeno (µg/cm <sup>2</sup> )	Tabla 4:			
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
Cantidad media de colágeno en cada constructo (n=3)	0	107.63 ± 21,96	329,85 ± 27,63	465,83 ± 49,46

Tabla 5:

Células (células/cm <sup>2</sup> )				
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
Número medio de células en cada constructo (n=3)	6,6 x 10 <sup>5</sup>	7,8 ± 2,2 x 10 <sup>5</sup>	9,6 ± 2,5 x 10 <sup>5</sup>	1,19 ± 2,1x 10 <sup>5</sup>

5 Además también estaban presente en el constructo célula-matriz glicosaminoglicano, decorina y fibrillas de colágeno producidos endógenamente.

Ejemplo 4: Constructo de piel de espesor total formado usando medio químicamente definido

10 Usando un constructo dérmico de 25 días formado por fibroblastos dérmicos humanos bajo condiciones químicamente definidas similares a las del método descrito en el ejemplo 3, se sembraron queratinocitos epidérmicos de prepucio de neonatos humanos normales en la superficie superior del constructo célula-matriz para formar la capa epidérmica del constructo de piel.

15 El medio se separó asépticamente del inserto del cultivo y del entorno. Se escalaron queratinocitos epidérmicos humanos normales hasta el cuarto pase de un subcultivo madre de células congeladas hasta la confluencia. Las células luego se liberaron de las placas de cultivo usando tripsina-versano, se acumularon y centrifugaron para formar un sedimento celular, se resuspendieron en medio de epidermalización, se contaron y se sembraron en la parte superior de la membrana en una densidad de 4,5 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Los constructos se incubaron posteriormente durante 90 minutos a 37 ± 1 °C, 10 % de CO<sub>2</sub> para permitir que se adhirieran los queratinocitos.

20 Después de la incubación, se sumergieron los constructos en medio de epidermalización. El medio de epidermalización está compuesto de una mezcla basal 3:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (que no contiene glucosa ni calcio, BioWhittaker, Walkersville, MD) y medio Hams F-12 (Quality Biologics Gaithersburg, MD), suplementado con 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma San Luis, MO), etanolamina 1 x 10<sup>-4</sup> M (Fluka, Ronkonkoma, NY), O-fosforiletanolamina 1 x 10<sup>-4</sup> M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO), 6,78 ng/ml de selenio (Aldrich), 24,4 µg/ml de adenina (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD), 50 µgm de la sal sódica del ácido L-ascórbico (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), ácido linoleico 16 µM (Sigma, San Luis, MO), acetato de tocoferol 1 µM (Sigma, San Luis, MO) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Amersham, Arlington Heights, IL). Los constructos se cultivaron en

25 el medio de epidermalización durante 2 días a 37 ± 1 °C, 10 ± 1 % de CO<sub>2</sub>.

30

Después de dos días, se cambió el medio con medio fresco compuesto como se indica anteriormente y se devolvió a la incubadora fijada a 37 ± 1°C, 10 ± 1 % de CO<sub>2</sub> durante dos días. Después de los dos días, el portador que contenía el constructo se transfirió asépticamente a bandejas de cultivo nuevas con medio suficiente para alcanzar

35 un nivel del líquido justo hasta la superficie de la membrana del portador para mantener el constructo en formación en la interfaz aire-líquido. El aire en contacto con la superficie superior de la capa epidérmica que se está formando permite la estratificación de la capa epitelial. Los constructos se incubaron a 37 ± 1 °C, 10 ± 1 % de CO<sub>2</sub> y baja humedad, en medio que se cambió cada 2-3 días durante 7 días. Este medio contenía una mezcla 1:1 del medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (que no contiene glucosa ni calcio, BioWhittaker, Walkersville, MD) y medio Hams F-12 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD), suplementado con 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina 5 x 10<sup>-4</sup> M (Fluka, Ronkonkoma, NY), O-fosforiletanolamina 5 x 10<sup>-4</sup> M (Sigma, San Luis, MO), 5 µ/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO), 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company), 24,4 µ/ml de adenina (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company), L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD), 2,65 µg/ml de cloruro cálcico (Mallinckrodt, Chesterfield, MO), ácido linoleico 16 µM (Sigma, San Luis, MO), acetato de tocoferol 1 µM (Sigma, San Luis, MO), serina 1,25 mM (Sigma, San Luis, MO), cloruro de colina 0,64 mM (Sigma, San Luis, MO) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Amersham, Arlington Heights, IL). Los cultivos se alimentaron cada 2-3 días, durante 14

40 días.

45

50 Se sometieron las muestras, por triplicado, 10, 12 y 14 días después de que el constructo se elevara a la interfaz aire-líquido al procedimiento de hematoxilina y eosina como se describe en el ejemplo 1 para determinar la apariencia física por microscopía óptica. El constructo resultante consistió en una capa inferior (dérmica) compuesta de fibroblastos rodeados por una matriz con las características descritas en el ejemplo 3, y se cubrió con una capa de queratinocitos diferenciados y estratificados.

55

Ejemplo 5: Formación *in vitro* de una matriz de colágeno por fibroblastos del tendón de Aquiles humano

Los constructos célula-matriz se formaron usando el mismo método descrito en el ejemplo 1 reemplazando los fibroblastos de prepucio de neonatos humanos por fibroblastos de tendón de Aquiles humanos (FAH). Después de

21 días en medio de producción, las muestras también se sometieron a la tinción de H&E y se determinó el grosor usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1. El constructo resultante se visualizó como un constructo célula-matriz similar al tejido con un grosor de  $75,00 \pm 27,58$  micrones ( $n=2$ ). También se apreció la presencia en el constructo de glicosaminoglicanos, decorina y colágeno fibrilar producidos endógenamente.

5 Ejemplo 6: Formación *in vitro* de una matriz de colágeno por fibroblastos de prepucio de neonatos humanos transfectados

10 Se produjeron fibroblastos dérmicos humanos transfectados siguiendo el siguiente procedimiento. Un vial de productores víricos de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDFG) jCRIP-43 (Morgan, J., et al) se descongeló y se sembraron las células a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/matraz de  $162 \text{ cm}^2$  (Corning Costar, Cambridge, MA). A esos matraces se adicionó medio de crecimiento y se mantuvieron en un incubador a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  con una atmósfera de  $10 \pm 1\%$  de  $\text{CO}_2$ . El medio de crecimiento consistió en: medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (formulación con una elevada cantidad de glucosa, sin L-glutamina, BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado con suero de ternero recién nacido al 10 % (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) y L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD). En el mismo día, se descongeló también un vial de fibroblastos de prepucio de neonatos humanos (HDFB156) y se sembró a una concentración de  $1,5 \times 10^6$  células/matraz de  $162 \text{ cm}^2$  (Corning Costar, Cambridge, MA). Después de tres días, los productores virales jCRIP PDGF-43 se alimentaron con medio de crecimiento fresco. Los fibroblastos HDFB156 se alimentaron con el medio de crecimiento mencionado anteriormente más  $8 \mu\text{g/ml}$  de polibreno (Sigma, San Luis, MO). Al día siguiente, las células HDFB 156 se infectaron tal como sigue. El medio agotado del cultivo de los productores virales jCRIP PDGF-43 se recogió y filtró a través de un filtro de 0,45 micrones. A este medio agotado y filtrado se añadieron  $8 \mu\text{g/ml}$  de polibreno. Se colocó posteriormente el medio agotado en los HDF. En los dos días siguientes los HDF se alimentaron con medio de crecimiento fresco. El día después los HDF se pasaron del paso 5 al paso 6, y se sembraron a una densidad de  $2,5 \times 10^6$  células/matraz de  $162 \text{ cm}^2$  (Corning Costar, Cambridge, MA). El pase de células fue como sigue: se aspiró el medio agotado. Los matraces se lavaron luego con una solución salina de tampón fostato para eliminar cualquier residuo de suero de ternero recién nacido. Las células se liberaron del matraz por adición de 5 ml de tripsina-versano a cada matraz y se agitaron suavemente para asegurar una cobertura completa de la monocapa. Se devolvieron los cultivos al incubador. Tan pronto como se liberaron las células, se añadieron a cada matraz 5 ml de SBTI (inhibidor de tripsina de soja) y se mezclaron con la suspensión para detener la acción de la tripsina-versano. La suspensión células/tripsina/SBTI se retiró de los matraces y se dividió equitativamente entre tubos de centrifuga cónicos estériles. Las células se recogieron por centrifugación a aproximadamente  $800\text{-}1000 \times g$  durante 5 minutos. Se resuspendieron las células en el medio de crecimiento para sembrarlas a la densidad mencionada anteriormente. Después de dos días las células se alimentaron con medio de crecimiento fresco. El día siguiente las células se recogieron como antes y se diluyeron a una densidad de  $1,5 \times 10^6$  células/ml en medio de crecimiento que contiene suero de ternero recién nacido al 10% (NBCS) con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, San Luis, MO). Las células se congelaron posteriormente a alrededor de  $-80^\circ\text{C}$ , 1ml/criovial.

40 La producción de la matriz de colágeno para este ejemplo utiliza los mismos procedimientos que los ejemplos 1 y 3, reemplazando los fibroblastos de prepucio de neonatos humanos con fibroblastos de prepucio de neonato humano transformados para producir cantidades elevadas del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDFG) como se describe anteriormente. Se tomaron muestras para la tinción H&E tal como se describe anteriormente el día 18 después de la siembra. Las muestras también se tiñeron usando los métodos de la avidina-biotina para determinar la presencia de fibronectina mencionados en el ejemplo 10. Se tomaron muestras en el día 18 después de la siembra para la tinción H&E como se describe en el ejemplo 1, y mostraron una apariencia macroscópica célula-matriz similar a la descrita en el ejemplo 1, con un grosor medido de 123,6 micrones ( $N=1$ ). Se midió la secreción de PDFG por parte de las células transfectadas en el constructo célula-matriz durante toda la duración del cultivo (18 días) por ELISA y resultó ser de  $100 \text{ ng/ml}$  mientras que la secreción control de PDFG fue indetectable.

50 Ejemplo 7: Uso del constructo dérmico como material de injerto

Se prepararon los constructos célula-matriz de acuerdo con los métodos del ejemplo 1 usando fibroblastos dérmicos humanos derivados del prepucio de neonatos y se injertaron en heridas de extirpación total creadas en ratones atímicos sin pelo. Los injertos en los ratones se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos descritos por Parenteau et al. (1996), cuyo contenido se incorpora aquí por referencia. Se examinaron los injertos los días 14, 28 y 56 buscando señales de adherencia al lecho de la herida, evidencia de contracción de la herida, áreas de pérdida del injerto y presencia de vascularización (color). Las áreas injertadas se fotografiaron mientras se mantuvieron intactas en los ratones. Un número de ratones fueron sacrificados en momentos determinados, y las áreas injertadas y sus entornos se extirparon junto con el borde circundante de piel murina llegando al menos hasta el panículo carnoso. Se conservaron las uniones entre los injertos y la piel murina de cada muestra. Las muestras de tejido explantadas se fijaron posteriormente en una disolución de formalina al 10 % en tampón fosfato y fijadas en metanol. Las muestras fijadas en metanol se procesaron para la tinción H&E de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Los injertos fueron capaces de integrarse con la piel del ratón, notándose una contracción mínima. En el plazo de catorce días después del injerto, la epidermis del ratón había migrado completamente sobre el injerto. Usando las muestras teñidas por H&E, los vasos sanguíneos eran obvios en el injerto a los 14 días, y a lo largo de

todo el experimento. Se determinó por una observación general y por la tinción H&E de las muestras que el injerto persistía y mantenía el aspecto saludable, contenía células vivas y no mostraba anomalías matriciales importantes, etc. a lo largo de la extensión de todo el experimento.

5 Ejemplo 8: Uso de constructos de piel de espesor total como un injerto de piel

Los constructos bicapa de piel se prepararon como se describe en el ejemplo 2 usando fibroblastos dérmicos humanos derivados de prepucio de neonato en la capa dérmica y queratinocitos humanos derivados de un prepucio de neonato diferente en la capa epidérmica. Los constructos de piel pudieron pelarse manualmente de la membrana, manipularse sin el soporte de un transportador y colocarse en el sitio del injerto. Los constructos bicapa de piel se injertaron en heridas de extirpación total creadas en ratones atímicos sin pelo de acuerdo con los métodos descritos por Parenteau et al (1996), cuyo contenido se incorpora aquí por referencia. Las fechas de evaluación determinadas para tomar las muestras fueron los días 7, 14, 28, 56 y 184 después del injerto. Las áreas del injerto se fotografiaron mientras se mantuvieron intactas en los ratones. Un número de ratones fueron sacrificados en cada fecha de evaluación, y las áreas injertadas y sus entornos se extirparon junto con el borde circundante de piel murina llegando al menos hasta el panículo carnoso. Se conservaron las uniones entre los injertos y la piel murina de cada muestra. Las muestras de tejido explantadas se fijaron entonces en una solución de formalina al 10% en tampón fosfato y fijada en metanol. Las muestras fijadas en formalina se procesaron para la tinción H&E de acuerdo con el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

Se observó que los injertos se integraron en el tejido del receptor en el plazo de 7 días tanto por observación macroscópica como por la apariencia histológica. Se visualizaron los vasos sanguíneos por tinción H&E, extendiéndose al injerto desde el tejido del receptor en un plazo de 7 días desde el injerto. Los injertos se conservaron sanos y se mantuvieron durante el experimento, notándose una contracción mínima. Se mostró la permanencia de células epidérmicas humanas durante todo el período del injerto utilizando la tinción con el anticuerpo anti-involucrina humana.

Ejemplo 9: Formación *in vitro* de una matriz por queratinocitos corneales humanos

Se utilizaron células de queratinocitos corneales humanos (originadas en Organogenesis, Inc. Canton, MA) en la producción de un constructo estromal de la cornea. Se liberaron cultivos confluentes de queratinocitos humanos de sus sustratos de cultivo utilizando tripsina-verseno. Una vez liberados, se utilizó el inhibidor de tripsina de la soja para neutralizar la tripsina-verseno, se centrifugó la suspensión celular, se desechó el sobrenadante y luego se resuspendieron las células en medio basal a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml. Se sembraron las células en una placa de seis pocillos con pocillos tratados transwell para cultivo celular de 24 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,4 micrones, a una densidad de  $3,0 \times 10^6$  células/TW ( $6,6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>). Estos cultivos se mantuvieron toda la noche en medio de siembra. El medio de siembra estaba compuesto de una mezcla de base 3:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y medio Hams F-12 (Quality Biologics Gaithersburg, MD cat.), GlutaMAX 4 mM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y aditivos: 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (EGF) (Upstate Biotechnology Lake Placid, NY), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY), O-fosforiletanolaamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO) y 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI). A continuación los cultivos se alimentaron con medio de producción fresco. El medio de producción estaba compuesto de una mezcla de base 3:1 de medio DMEM y Hams F-12 (Quality Biologics Gaithersburg, MD), GlutaMAX 4 mM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y aditivos: 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (Upstate Biotechnology Lake Placid, NY), suero de ternero recién nacido al 2 % (Hyclone, Logan, Utah), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, MY Grado ACS), O-fosforiletanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO) y 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI), 50 ng/ml de ácido L-ascórbico (WAKO pure chemical company), 0,2 µg/ml de L-prolina (Sigma, San Luis, MO), 0,1 µg/ml de glicina (Sigma, San Luis, MO) y polietilenglicol (PEG) al 0,05 % (Sigma, San Luis, MO, grado de cultivo celular).

Se mantuvieron las células en un incubador a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  con una atmósfera del  $10\% \pm 1\%$  de CO<sub>2</sub> y se alimentaron con medio de producción fresco cada 2-3 días durante 20 días (durante un total de 21 días de cultivo). Después de 21 días de cultivo, los queratinocitos habían depositado una capa matricial de un grosor de alrededor de 40 micrones, medido por el método descrito en el ejemplo 1. También estaban presentes en el constructo célula-matriz glicosaminoglicano, decorina y colágeno fibrilar producido endógenamente.

Ejemplo 10: Formación *in vitro* de una matriz de colágeno por fibroblastos de prepucio de neonatos humanos sembrados en medio de producción

Fibroblastos de prepucio de neonatos humanos (originados en Organogenesis, Inc. Canton, MA) se sembraron a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/platos de seis pocillos, con portadores tratados de cultivo celular de 24 mm de

diámetro y un tamaño de poro de 0,4 micrones (TRANSWELL®, Costar Corp. Cambridge, MA) y se dejaron crecer en medio de crecimiento. El medio de cultivo consistió en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (formulación con una cantidad elevada de glucosa, sin L-glutamina, BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado con suero de ternero recién nacido al 10 % (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) y L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD). Las células se mantuvieron en un incubador a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  con una atmósfera del  $10 \pm 1\%$  de  $\text{CO}_2$ . Se reemplazó el medio cada dos o tres días. Después de 9 días en cultivo, se aspiró el medio de la placa de cultivo y se reemplazó con medio de producción. Se mantuvieron las células en un incubador a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  con una atmósfera del  $10 \pm 1\%$  de  $\text{CO}_2$  y se alimentaron con medio de producción fresco cada 2-3 días durante 21 días. El medio de producción estaba compuesto de una mezcla basal 3:1 de medio DMEM y medio Hams F-12 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD), GlutaMAX 4mM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y aditivos: 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), suero de ternero recién nacido al 2% (Hyclone, Logan, Utah), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma St. Louis, MO), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY, grado ACS), O-fosforiletanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, St. Louis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO) y 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI), 50 ng/ml de ácido L-ascórbico (WAKO Pure Chemical Company), 0,2 µg/ml de L-prolina (Sigma, San Luis, MO), 0,1 µg/ml de glicina (Sigma, San Luis, MO) y polietilenglicol (PEG) al 0,05% (Sigma, San Luis, MO, grado de cultivo celular).

Se tomaron muestras el día 21 y se fijaron en formalina, luego se embebieron en parafina. Las muestras fijadas en formalina se embebieron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) secciones de 5 micrómetros de acuerdo con las técnicas usadas en la técnica de manera rutinaria. Usando las secciones teñidas por H&E, se midieron diez campos microscópicos elegidos de manera aleatoria usando un ocular 10 X (Olympus America Inc., Melville, NY) equipado con un retículo de 100 mm/100 micrómetros (Olympus America Inc., Melville, NY). Los constructos creados usando este método son similares en estructura y composición bioquímica a aquellos creados con el ejemplo 1 y tienen un espesor medido de  $82,00 \pm 7,64$  micrones.

#### Ejemplo 11: Formación *in vitro* de una matriz de colágeno por fibroblastos dérmicos porcinos

Se sembraron fibroblastos dérmicos porcinos (originados en Organogenesis, Inc. Canton, MA) a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/matraz tratado de cultivo celular de  $162 \text{ cm}^2$  (Costar Corp., Cambridge, MA. Cat # 3150) y se dejaron crecer en medio de crecimiento como se describe a continuación. El medio de crecimiento consistió en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (formulación con elevada cantidad de glucosa, sin L-glutamina, BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado con suero fetal de ternero al 10 % (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) y L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD). Las células se mantuvieron en un incubador a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  en una atmósfera del  $10\% \pm 1\%$  de  $\text{CO}_2$ . El medio se reemplazó cada dos o tres días. Cuando se alcanzó la confluencia, es decir, cuando las células hubieron formado una capa empaquetada en el fondo del matraz de cultivo tisular, se aspiró el medio de la placa de cultivo. Para lavar la monocapa, se adicionó a la misma una solución salina con tampón fosfato, esterilizada por filtración y se aspiró a continuación de la placa. Se liberaron las células del matraz por adición a cada matraz de 5 ml de glutamina tripsina-verseno (BioWhittaker, Walkersville, MD) y se agitaron suavemente para asegurar una cobertura completa de la monocapa. Se devolvieron los cultivos al incubador. Tan pronto como se liberaron las células se añadieron a cada matraz 5 ml de SBTI (inhibidor de tripsina de soja) y se mezclaron con la suspensión celular para detener la acción de la tripsina-verseno. Se separó la suspensión de los matraces y se dividió de manera equitativa entre tubos cónicos de centrifuga estériles. Se recogieron las células por centrifugación a aproximadamente 800-1000 x g durante 5 minutos. Se resuspendieron las células y se diluyeron a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml, se sembraron en una placa de seis pozos, con pozos transwell tratados de cultivo tisular de un diámetro de 24 mm y un tamaño de poro de 0,4 micrones, a una densidad de  $3,0 \times 10^6$  células/TW ( $6,6 \times 10^5$  células/ $\text{cm}^2$ ). Las células se mantuvieron toda la noche en medio de siembra. El medio de siembra consistió en una mezcla basal 3:1 de medio DMEM y medio Hams F-12 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD), GlutaMAX 4 mM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y aditivos: 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (Upstate Biotechnology Lake Placid, NY), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY, grado ACS), O-fosforiletanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO), y 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI), 50 ng/ml de ácido L-ascórbico (WAKO Pure Chemical Company), 0,2 µg/ml de L-prolina (Sigma, San Luis, MO) y 0,1 µg/ml de glicina (Sigma, San Luis, MO). Las células se mantuvieron en un incubador a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  en una atmósfera del  $10 \pm 1\%$  de  $\text{CO}_2$  y se alimentaron con medio de producción fresco cada 2-3 días durante 7 días. El medio de producción estaba compuesto de una mezcla basal 3:1 de medio DMEM y medio Hams F.12 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD), GlutaMAX 4 mM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y aditivos: 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), suero de ternero recién nacido al 2% (Hyclone, Logan, Utah), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY, grado ACS), O-fosforiletanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO) y 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Co., Milwaukee, WI), 50 ng/ml de ácido L-ascórbico (WAKO Pure Chemical Company), 0,2 µg/ml de L-prolina (Sigma, San Luis, MO), 0,1 µg/ml de glicina (Sigma, San Luis, MO) y polietilenglicol (PEG) al 0,05% (Sigma, San Luis, MO) grado de cultivo celular. Al cabo de 7 días, el medio se

reemplazó con medio de producción sin suero de ternero recién nacido. Las células se alimentaron con este medio fresco cada 2-3 días durante 20 días más, sumando un total de 28 días de cultivo. Se tomaron muestras el día 21 y se fijaron en formalina, se embebieron posteriormente en parafina. Las muestras fijadas en formalina se embebieron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) secciones de 5 micrómetros de acuerdo con las técnicas usadas rutinariamente en la técnica. Usando portaobjetos teñidos por H&E se midieron diez campos microscópicos elegidos al azar usando un ocular 10 X (Olympus America Inc., Melville, NY) equipado con un retículo de 100 mm/100 micrómetros (Olympus America Inc., Melville, NY). La muestra exhibió una estructura compuesta de células y matriz con un espesor medido de  $71,20 \pm 9,57$  micrones. Además, también se observaron presentes en el constructo célula-matriz glicosaminoglicano, decorina y colágeno fibrilar producido endógenamente

Ejemplo 12: Formación *in vitro* de un constructo de piel bicapa que contiene células de la papila dérmica

Se obtuvo una célula-matriz de acuerdo con el método del ejemplo 1 usando fibroblastos de prepucio de neonatos humanos como un primer tipo celular productor de la matriz. Se sembró localmente la célula-matriz con puntos de células de papila dérmica como la segunda población celular, la cual, a su vez, se sembró con queratinocitos como tercera población celular, para formar una capa epidérmica continua sobre la célula-matriz y las células de la papila dérmica.

Primero se formó un constructo célula-matriz usando fibroblastos dérmicos humanos (HDF) derivados de prepucio de neonatos. Se escalonaron los HDF sembrándolos a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/matraz tratado de cultivo tisular de  $162 \text{ cm}^2$  (Costar Corp., Cambridge, MA) en medio de crecimiento que consistió en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (formulación con elevada cantidad de glucosa, sin L-glutamina, BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado con suero de ternero recién nacido al 10% (NBCS) (HyClone Laboratories, Inc., Logan, Utah) y L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD). Cuando llegaron a la confluencia, se liberaron los HDF de la placa usando tripsina-verseno y se resuspendieron utilizando medio fresco hasta una concentración de  $3,0 \times 10^6$  células/ml y se sembraron en placas de seis pozos con insertos tratados para cultivo tisular de 24 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,4 micrones (TRANSWELL®, Coming Costar) a una densidad de  $3,0 \times 10^6$  células/inserto ( $6,6 \times 10^5$  células/ $\text{cm}^2$ ). Los cultivos de HDF se mantuvieron en un incubador a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  en una atmósfera de  $10 \pm 1\%$  de  $\text{CO}_2$  y se alimentaron con medio de producción fresco cada dos o tres días durante 23 días, de acuerdo con el método detallado en el ejemplo 1.

Una vez formado el constructo célula-matriz, se sembró con puntos de células de papila dérmica como segunda población celular. Las células de papila dérmica son una población discreta de fibroblastos especializados rodeados por el bulbo piloso de los folículos pilosos que juegan un papel de soporte en el crecimiento del pelo. Las papilas dérmicas pueden aislarse por microdissección de los folículos pilosos y por cultivo *in vitro* usando el método descrito previamente por Messenger, AG., The Culture of Dermal Papilla Cells from Human Hair Follicles. Br. J. Dermatol. 110: 685-9 (1984), cuyo método se incorpora en la presente. Cuando un cultivo de células de papila dérmica alcanza la confluencia forman agregados que pueden volver a colocarse en matraces de cultivo para formar nuevos agregados. Las papilas dérmicas se aislaron de una biopsia de piel obtenida de un cerdo de 4 semanas de edad. Las células de la papila dérmica (PDP) se cultivaron de manera consecutiva en DMEM que contenía un 20 % de NBCS hasta el pase 8. Después de 3 semanas en cultivo, las células de PDP volvieron a formar estructuras similares a las de la papila dérmica, o agregados, cada una con un diámetro aproximado de entre aproximadamente 90 a 210 micrones. Los agregados posteriormente se separaron de la placa de cultivo pipeteando vigorosamente el medio contra ellos, y se sembraron a continuación sobre la matriz de colágeno humano a una densidad de 200 agregados por  $\text{cm}^2$ . Los agregados se cultivaron 15 días más sumergidos en DMEM con un 20% de NBCS reemplazando el medio agotado por medio fresco cada 2-3 días.

Los cultivos célula-matriz con células de papila dérmica sobre ellas se sembraron con queratinocitos y se cultivaron para formar una capa epidérmica continua sobre la célula-matriz y las papilas dérmicas. Se hicieron dos constructos diferentes: el primero con queratinocitos humanos, el segundo con queratinocitos porcinos. Se aislaron los queratinocitos epidérmicos normales del prepucio de neonatos humanos (HEP) o de queratinocitos porcinos (PEP) usando la técnica del explanto para establecer cultivos primarios. A continuación estas células se cultivaron y expandieron hasta el pase 3 para la cepa porcina o hasta el pase 4 para la cepa humana. Después de alrededor de 5 o 6 días en cultivo, se liberaron las células de las placas de cultivo usando tripsina-verseno, se acumularon, se centrifugaron para obtener un sedimento celular, se resuspendieron en medio de epidermalización, se contaron y se sembraron en la parte superior de la membrana a una densidad de  $4,5 \times 10^4$  células/ $\text{cm}^2$  para células HEP o  $1,6 \times 10^5$  células/ $\text{cm}^2$  para células PEP. Los cultivos epidermalizados se cultivaron durante 12 días tal y como se describió anteriormente en el ejemplo 2.

Las muestras finales se sometieron al procesado de hematoxilina y eosina para microscopía óptica. Los constructos de piel resultantes mostraron una organización morfológica básica similar a la de la piel: una capa dérmica que consiste en fibroblastos rodeados por una matriz producida endógenamente, incluyen glicosaminoglicano, decorina y colágeno fibrilar producido endógenamente, áreas localizadas de células de papila dérmica y una capa estratificada y continua de queratinocitos a lo largo del constructo célula-matriz y las papilas dérmicas. Tanto en los constructos tisulares cubiertos con queratinocitos porcinos como en los cubiertos con queratinocitos humanos, la

papila dérmica mantuvo una estructura empaquetada que provocó pequeñas ondulaciones en el epitelio superpuesto. Las células epiteliales diferenciadas a menudo están cerca de las células de papila dérmica.

#### 5 Ejemplo 13: Medida de ácido hialurónico por ELISA sándwich

Se midió el ácido hialurónico (AH) en constructos célula-matriz formados por fibroblastos dérmicos en medio con suero y medio químicamente definido de acuerdo con los métodos de los ejemplos 1 y 3 respectivamente.

10 Se formaron constructos célula-matriz en portadores circulares de 75 mm de diámetro con una membrana porosa incorporada (TRANSWELL®, Corning Costar). Se prepararon extractos de los constructos célula-matriz por adición de 10 ml de tampón de acetato amónico y 0,5 mg/ml de proteinasa K a un tubo de ensayo que contenía un constructo célula-matriz. La mezcla se incubó a 60 °C toda la noche. Una vez que se completó la digestión, la mezcla se centrifugó y el extracto del sobrenadante se transfirió a un tubo separado para el ensayo del ácido hialurónico. Se revistió una placa de 96 pocillos con 50 µl de una disolución de la proteína de unión del ácido hialurónico de 20 µg/ml en una solución de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M y se almacenó toda la noche a 4 °C. La placa se lavó posteriormente tres veces con una solución de NaCl al 0,85 % que contenía un 0,05 % de Tween 20. A continuación se añadieron a cada pocillo 250 µl de solución bloqueadora (tampón de fosfato sódico, 10 mmol, pH = 7,4 con un 3 % de BSA y un 0,9 % de NaCl, PBS + 3 % BSA) y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 2 h. La placa se lavó a continuación tres veces con una solución de NaCl al 0,85 % que contenía un 0,05 % de Tween 20. A continuación se adicionaron a la placa 50 µl de soluciones patrón de AH y extractos obtenidos con ambas condiciones experimentales, incluyendo varias diluciones de esas condiciones. Se incubó la placa a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C) durante 2 horas. Se lavó entonces la placa tres veces con una solución de NaCl al 0,85 % que contenía un 0,05 % de Tween 20 y se añadieron a cada pocillo 50 µl de AH biotinilado (dilución 1:2000) y luego se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavó la placa posteriormente tres veces con una solución de NaCl al 0,85 % que contenía un 0,05 % de Tween 20 y a continuación se añadieron a cada pocillo 50 µl de HRP-avidina D (dilución 1:3000). Se incubó la placa durante 45 minutos a temperatura ambiente. La placa de lavó luego tres veces con una solución de NaCl al 0,85 % que contenía un 0,05 % de Tween 20 y se añadieron a cada pocillo 100 µl de una solución sustrato de orto-fenilendiamina. Se incubó la placa a 37 °C durante 10 minutos. Se paró la reacción por adición de 50 µl de HCl 1M. Finalmente, usando un lector de placas, se leyó la absorbancia a 492 nm y se grabó.

Se calculó la media de las medidas de la absorbancia y se convirtió a medidas de cantidad. Se determinó que cada constructo célula-matriz circular (75 mm de diámetro) formado en medio con suero contenía alrededor de 200 µg de ácido hialurónico mientras que cada uno de aquellos formados en medio químicamente definido contenía alrededor de 1,5 mg de ácido hialurónico.

#### Ejemplo 14: Pruebas físicas y propiedades mecánicas del constructo célula-matriz producido

40 Se cuantificaron las propiedades mecánicas de los constructos tisulares del ejemplo 1 (constructo célula-matriz), el ejemplo 2 (constructo célula-matriz con una capa de queratinocitos sobre él) y el ejemplo 3 (constructo célula-matriz formado en medio definido) mediante los ensayos de inflado de la membrana. Estos ensayos son similares a los ensayos usados clínicamente (p. ej. Dermaflex®, Cyberderm Inc., Media, PA y Cutameter®, Courage Khazaka, Colonia, Alemania) pero implica presiones más altas, incluyendo presiones capaces de hacer estallar la membrana. El constructo célula-matriz de muestra se extendió en un bloque de policarbonato centrado sobre un pocillo cilíndrico de 10 mm de diámetro relleno con solución salina normotónica. Una placa de metal con un hueco circular que se correspondía con el diámetro del pocillo cilíndrico se situó sobre la muestra y se fijó al bloque. Se inflaron luego las muestras añadiendo más solución salina en el pocillo con una bomba de jeringa. Se midió la presión resultante con un transductor de presión. Se llevó a cabo la presurización hasta fallo del dispositivo, la resistencia a la rotura media fue de 439,02 mm de Hg para los constructos célula-matriz generados por el método del ejemplo 1; 998,52 mm de Hg para las muestras de los constructos célula-matriz con una capa de queratinocitos generados por el método del ejemplo 2; y de 1542,26 mm de Hg para las muestras de los constructos célula-matriz formados en medio definido de acuerdo con el método del ejemplo 3.

55 Para determinar el punto de fusión térmico de la matriz dérmica, se prepararon muestras (constructo célula-matriz), tomadas a los 21 días, usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1. La temperatura de desnaturalización de las muestras se determinó mediante análisis con un calorímetro de barrido diferencial (DSC producto #DSC12E) de Mettler Toledo (Highston, NJ). Para nuestros propósitos, la temperatura de fusión se determinó calentando la muestra de 45 a 80 °C a una velocidad de 1 °C/minuto. La temperatura media de desnaturalización para las muestras es 60,8 ± 1,2°C (n=3).

65 La retención de sutura y la resistencia a la tensión de la matriz epidermalizada creada usando los procedimientos del ejemplo 1 (constructo célula-matriz) y 3 (constructo célula-matriz formado en un medio definido) se midieron para determinar la suturabilidad del constructo en ciertas situaciones clínicas. La fuerza de retención de sutura de la matriz dérmica humana de 21 días se determinó usando el método descrito en la publicación nacional americana de

los estándares para las prótesis de injerto vascular (Instruments, 1986) usando un sistema de ensayo Mini-Bionex 858 (MTS systems Corporation, Mineápolis, Minn.)

5 Para las muestras del ejemplo 1, (constructo célula-matriz), se determinó que la resistencia a la tracción fue de 365 N/m; para las muestras preparadas de acuerdo con el ejemplo 2 (constructo célula-matriz con una capa de queratinocitos), la resistencia a la tracción fue de 2720 N/m.

10 La fuerza de retención de sutura de las muestras preparadas de acuerdo con el ejemplo 1 fue de 0,14 N; para aquellas preparadas de acuerdo con el ejemplo 2, de 0,22 N.

15 Los constructos creados según se describe en los ejemplos 1, 2 y 3 se han hecho con diámetros tanto de 24 mm como de 75 mm. Los constructos hechos por las técnicas de cultivo de los tres métodos son estructuras cohesivas similares al tejido, que se pelan fácilmente de la membrana con una fuerza mínima, por tanto son "pelables" y capaces de ser manejadas físicamente y manipuladas para su uso y ensayo sin que ocurra daño.

20 Ejemplo 15: Formación *in vitro* de una matriz de colágeno por fibroblastos de prepucio de neonatos humanos en un medio químicamente definido

25 Los fibroblastos de prepucio de neonatos humanos se expandieron usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Luego se resuspendieron las células a una concentración de  $3 \times 10^6$  células/ml y se sembraron en un placa de seis pocillos con insertos de membrana tratados para cultivo tisular de 24 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,4 micrones, a una densidad de  $3,0 \times 10^6$  células/TW ( $6,6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>). Las células de este ejemplo se cultivaron en un medio químicamente definido durante todo el experimento.

30 El medio contenía: una mezcla basal 3:1 de medio DMEM y medio Hams F-12 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD), GlutaMAX 4 mM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y aditivos: 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY cat. #02400, grado ACS), O-fosforiletanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 p M (Sigma, San Luis, MO) y 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), 50 ng/ml de ácido L-ascórbico (WAKO Chemicals USA, Inc.), 0,2 µg/ml de L-prolina (Sigma, San Luis, MO), 0,1 µg/ml de glicina (Sigma, San Luis, MO).

Al medio básico descrito anteriormente, se añadieron otros componentes en estas condiciones separadas:

- 35 1. 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), polietilenglicol (PEG) al 0,05 % (PEG) (Sigma, San Luis, MO).
2. 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO).
3. 375 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 6 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO).

40 Las muestras se fijaron en formalina y se procesaron para la tinción con hematoxilina y eosina para el análisis por microscopía óptica. La evaluación histológica visual demostró que la condición 2 sin PEG mostraba una matriz similar y comparable a la de la condición 1 con PEG. Los análisis bioquímicos para medir el contenido de colágeno del constructo mostraron casi la misma cantidad de colágeno en los dos:  $168,7 \pm 7,98$  µg/cm<sup>2</sup> para la condición 1 con PEG en comparación con  $170,88 \pm 9,07$  µg/cm<sup>2</sup> para la condición 2 sin PEG. La condición 3, que contenía elevados niveles de insulina e hidrocortisona, mostró una mayor expresión de la matriz, incluyendo colágeno, en una fecha de evaluación anterior a las otras dos condiciones. Además glicosaminoglicano, decorina y colágeno fibrilar producidos endógenamente también estaban presentes en los constructos célula-matriz en todas las condiciones. El constructo dérmico cultivado formado por el método de la condición 2 de este ejemplo se muestra en la figura 2. Se muestra en la figura 2 una microfotografía de una sección fijada, embebida en parafina, teñida con hematoxilina y eosina de un constructo célula-matriz formado de fibroblastos dérmicos humanos cultivados en un medio químicamente definido a los 21 días. La membrana porosa aparece como una banda translúcida delgada debajo del constructo y puede verse que las células crecen en la superficie de la membrana y no envuelven o integran la membrana con la matriz.

50 La figura 3 muestra imágenes obtenidas con un microscopio electrónico de transmisión (MET) de dos ampliaciones de constructos dérmicos cultivados formados por el método de la condición 2 de este ejemplo a los 21 días. La figura 55 3A es una ampliación 7600 X que muestra la alineación de las fibras de colágeno endógenas entre los fibroblastos. La figura 3B es una ampliación 19000 X de fibras de colágeno endógenas totalmente formadas mostrando la disposición y el empaquetamiento de las fibrillas.

60 En todas las condiciones de este ejemplo, los constructos dérmicos cultivados formados comprenden fibroblastos dérmicos y una matriz producida endógenamente. Todos tienen fibrillas de colágeno totalmente formadas en una organización empaquetada dispuesta entre las células. Sus cualidades fibrosas, espesor e integridad cohesiva dan al constructo una fuerza considerable para permitir que se separe mediante pelado de la membrana del cultivo y se manipule según se transfiere al paciente que va a ser tratado con el constructo, bien en un injerto o implante.

Ejemplo 16: Constructos de piel de espesor total

Usando un constructo dérmico de 21 días formado por fibroblastos dérmicos humanos bajo condiciones químicamente definidas de acuerdo con el método de la condición 2 (sin PEG) descrito en el ejemplo 15, arriba, se sembraron queratinocitos epidérmicos de prepucio de neonatos humanos normales en la superficie superior del constructo célula-matriz para formar la capa epidérmica del constructo de piel.

5 El medio se separó asépticamente del inserto de cultivo y de su entorno. Se escalaron queratinocitos epidérmicos humanos normales hasta el pase 4 de un subcultivo congelado de una disolución madre de células hasta la confluencia. Se liberaron posteriormente las células de las placas de cultivo usando tripsina-verseno, se acumularon, se centrifugaron para formar un sedimento celular, se resuspendieron en medio de epidermalización, se contaron y se sembraron en la superficie de la membrana a una densidad de  $4,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Los constructos se incubaron luego durante 90 minutos a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , en una atmósfera con un 10% de CO<sub>2</sub> para permitir la adhesión de los queratinocitos. Después de la incubación, se sumergieron los constructos en medio de epidermalización. El medio de epidermalización se compone de una mezcla de base 3:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (que no contiene ni glucosa ni calcio, BioWhittaker, Walkersville, MD) y medio Hams F-12 (Quality Biologics Gaithersburg, MD), suplementado con 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma San Luis, MO), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY), O-fosforiletanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO), 6,78 ng/ml de selenio (Aldrich), 24,4 µg/ml de adenina (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD), 50 µg/ml de la sal sódica del ácido L-ascórbico (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), ácido linoleico 16 µM (Sigma, San Luis, MO), acetato de tocoferol 1 µM (Sigma, San Luis, MO) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Amersham, Arlington Heights, IL). Los constructos se cultivaron en el medio de epidermalización durante 2 días a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , y una atmósfera al  $10 \pm 1\%$  de CO<sub>2</sub>.

Después de dos días se cambió el medio por medio fresco compuesto tal y como se describe anteriormente y se devolvió al incubador con unas condiciones fijadas de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , y una atmósfera al  $10 \pm 1\%$  de CO<sub>2</sub> durante 2 días. Después de 2 días, el portador que contenía el constructo se transfirió asépticamente a nuevas bandejas de cultivo con medio suficiente para conseguir que el nivel de líquido alcanzara justo la superficie de la membrana del portador para mantener el constructo en desarrollo en la interfaz aire-líquido. El aire en contacto con la superficie superior de la capa epidérmica en formación permite la estratificación de la capa epitelial. Se incubaron los constructos a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , un 10% de CO<sub>2</sub> y baja humedad en un medio que se cambió cada 2-3 días durante 7 días. Este medio contenía una mezcla 1:1 del medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (que no contenía ni glucosa ni calcio, BioWhittaker, Walkersville, MD) y medio Hams F-12 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD), suplementado con 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina  $5 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY), O-fosforiletanolamina  $5 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO), 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company), 24,4 µg/ml de adenina (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company), L-glutamina 4 mM (BioWhittaker, Walkersville, MD), 2,65 µg/ml de cloruro cálcico (Mallinckrodt, Chesterfield, MO), ácido linoleico 16 µM (Sigma, San Luis, MO), acetato de tocoferol 1 µM (Sigma, San Luis, MO), serina 1,25 mM (Sigma, San Luis, MO), cloruro de colina 0,64 mM (Sigma, San Luis, MO) y 50 µg/ml de sulfato de gentamicina (Amersham, Arlington Heights, IL). Los cultivos se alimentaron cada 2-3 días, durante 14 días.

Se sometieron las muestras, por triplicado, 10, 12 y 14 días después de que el constructo se elevara a la interfaz aire-líquido para el proceso de hematoxilina y eosina como se describe en el ejemplo 1 para determinar la apariencia física por microscopía óptica. El constructo resultante fue un constructo de piel bicapa que consistía en una capa dérmica inferior que consiste en fibroblastos dérmicos rodeados por una matriz cubierta por una capa superior epidérmica de queratinocitos diferenciados y estratificados. El constructo de piel bicapa de este ejemplo se muestra en la figura 4. La figura 4 es una microfotografía de una sección fijada, embebida en parafina y teñida con hematoxilina y eosina de un constructo de piel cultivado, formado en un medio químicamente definido en ausencia de componentes matriciales exógenos, que comprende un constructo célula-matriz formado a partir de fibroblastos dérmicos humanos en un medio químicamente definido con una epidermis diferenciada y en multicapa formada a partir de queratinocitos humanos cultivados en un medio químicamente definido.

Ejemplo 17: Formación de una matriz de colágeno por fibroblastos bucales humanos

El objetivo de este experimento es producir un constructo célula-matriz de fibroblastos bucales aislados de tejido de la mejilla humana. Se cultivaron fibroblastos bucales en matraces T-150 en DMEM que contenían un 10% de medio NBS. Después de 7 días, para expandir aún más el número de células, se recogieron células bucales y se pasaron a nueve matraces T-150 a una concentración de  $4,0 \times 10^6$  células en medio DMEM con un 10 % de medio NBS y se cultivaron hasta la confluencia, momento en el que se recolectaron las células.

Para recolectar las células, se aspiró el medio del matraz de cultivo. Para lavar la monocapa, se añadió una disolución salina con tampón fosfato esterilizada por filtración a la parte inferior de cada matraz de cultivo y luego se aspiró de los matraces. Se liberaron las células del matraz por adición de 5 ml de tripsina-verseno glutamina (BioWhittaker, Walkersville, MD) a cada matraz y por agitación suave para asegurar una completa cobertura de la monocapa. Se devolvieron los cultivos al incubador. Tan pronto como se liberaron las células se añadieron 5 ml de SBTI (inhibidor de tripsina de soja) y se mezclaron con la suspensión para parar la acción de la tripsina-verseno. La

suspensión celular se recogió de los matraces y se dividió de manera equitativa entre tubos cónicos de centrifuga estériles. Las células se recogieron por centrifugación a aproximadamente 800-1000 x g por 5 minutos.

5 Las células se suspendieron usando medio fresco hasta una concentración de  $3,0 \times 10^6$  células/ml, y se sembraron en una placa de seis pocillos con insertos tratados para cultivo tisular de 24 mm de diámetro (TRANSWELL®, Corning Costar) con un tamaño de poro de 0,4 micrones, a una densidad de  $3,0 \times 10^6$  células/inserto ( $6,6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>). Las células se mantuvieron en un incubador a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  con una atmósfera de  $10 \pm 1\%$  de CO<sub>2</sub> y se alimentaron con medio que contenía una mezcla base 3:1 de medio DMEM y medio Hams F-12 (Quality Biologics, Gaithersburg, MD), GlutaMAX 4 mM (Gibco BRL, Grand Island, NY) y aditivos: 5 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma, San Luis, MO), etanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Fluka, Ronkonkoma, NY cat. #02400, grado ACS), O-fosforiletanolamina  $1 \times 10^{-4}$  M (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de insulina (Sigma, San Luis, MO), 5 µg/ml de transferrina (Sigma, San Luis, MO), triyodotironina 20 pM (Sigma, San Luis, MO) y 6,78 ng/ml de selenio (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), 50 ng/ml de ácido L-ascórbico (WAKO Chemicals USA, Inc.), 0,2 µg/ml de L-prolina (Sigma, San Luis, MO), 0,1 µg/ml de glicina (Sigma, San Luis, MO) y polietilenglicol (PEG) al 0,05% (Sigma, San Luis, MO).

10 El día 1 después de la siembra, se reemplazó el medio con medio de producción libre de suero, se cambió cada 2-3 días durante 21 días. El día 21, se fijaron las muestras en formalina, para el análisis histológico. Se usaron tres muestras para el análisis de la producción de colágeno y proteína.

20 La producción de colágeno para los constructos de 24 mm de diámetro tuvo un valor medio de 519 µg por constructo después de un cultivo de 21 días. La producción total de proteína para los constructos de 24 mm de diámetro tuvo un valor medio de 210 µg por constructo, tras un cultivo de 21 días. Morfológicamente, el constructo célula-matriz de fibroblastos bucales, un constructo tisular cultivado de tejido conjuntivo oral, mostró fibroblastos bucales rodeados por una matriz mientras que físicamente, el constructo tenía integridad y volumen físico.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un constructo tisular cultivado preparado por crecimiento de células de fibroblasto bajo condiciones para producir una capa de matriz extracelular que se sintetiza y ensambla por las células de fibroblasto, con las células de fibroblasto cultivadas contenidas en la capa matricial extracelular sintetizada, donde las células de fibroblasto se cultivan en un medio químicamente definido libre de extractos tisulares o de órganos animales no definidos y donde el medio de cultivo celular químicamente definido comprende:
- (i) un medio base nutriente;
  - (ii) insulina;
  - (iii) L-glutamina o L-alanil-L-glutamina; y
  - (iv) ascorbato o un derivado del ascorbato
- y donde las células de fibroblasto producen la matriz extracelular mencionada en ausencia de componentes matriciales exógenos o miembros sintéticos durante las condiciones de cultivo.
2. El constructo tisular cultivado de la reivindicación 1, donde los fibroblastos se derivan de tejido seleccionado del grupo formado por el prepucio de neonatos masculinos, la dermis, el tendón, el pulmón, la uretra, el cordón umbilical, el estroma corneal, la mucosa oral y el intestino.
3. El constructo tisular cultivado de la reivindicación 1, donde las células cultivadas mencionadas son fibroblastos dérmicos.
4. El constructo tisular cultivado de la reivindicación 1, donde las células cultivadas mencionadas son de la papila dérmica de folículos pilosos.
5. El constructo tisular cultivado de la reivindicación 1, donde la capa mencionada tiene células cultivadas de la papila dérmica de folículos pilosos localizados en dicha capa.
6. El constructo tisular cultivado de la reivindicación 1, donde las células cultivadas son células transfectadas, células recombinantes o células modificadas genéticamente.
7. El constructo tisular cultivado de la reivindicación 1, donde las células cultivadas son células madre mesenquimales.
8. El constructo tisular cultivado de la reivindicación 1, donde la matriz extracelular tiene un espesor de al menos 60 micrones.
9. El constructo tisular cultivado de la reivindicación 1, donde la matriz extracelular tiene un espesor de al menos 120 micrones.
10. Un método para producir un constructo tisular cultivado, que comprende,
- (a) sembrar células de fibroblasto humanas capaces de sintetizar una matriz extracelular en una membrana porosa, en un recipiente de cultivo en un medio de cultivo celular químicamente definido, donde el medio de cultivo celular químicamente definido está libre de tejidos u órganos animales no definidos y comprende:
    - (i) un medio base nutriente;
    - (ii) insulina;
    - (iii) L-glutamina o un derivado de la L-glutamina; y
    - (iv) ascorbato o un derivado del ascorbato; que estimula de este modo las células de fibroblasto, las cuales están al menos a una confluencia del 80 %, para sintetizar, secretar y organizar componentes matriciales extracelulares; y,
  - (b) continuar el cultivo de células de fibroblasto hasta que las células formen una capa de la matriz extracelular sintetizada de un espesor de, al menos, 30 micrones, donde las células de fibroblasto cultivadas están contenidas en la capa matricial extracelular sintetizada, y donde las células de fibroblastos cultivadas en una superficie de la membrana porosa en ausencia de componentes matriciales extracelulares exógenos producen la matriz extracelular mencionada durante las condiciones del cultivo.
11. El método de la reivindicación 10, donde en el paso (a) las células de fibroblasto se siembran a una densidad de entre alrededor de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> a alrededor de  $6,6 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>.
12. El método de la reivindicación 10, donde las células de fibroblasto se derivan de tejido seleccionado del grupo formado por prepucio de neonatos masculinos, cordón umbilical, dermis, tendón, pulmón, uretra, estroma corneal, mucosa oral e intestino.

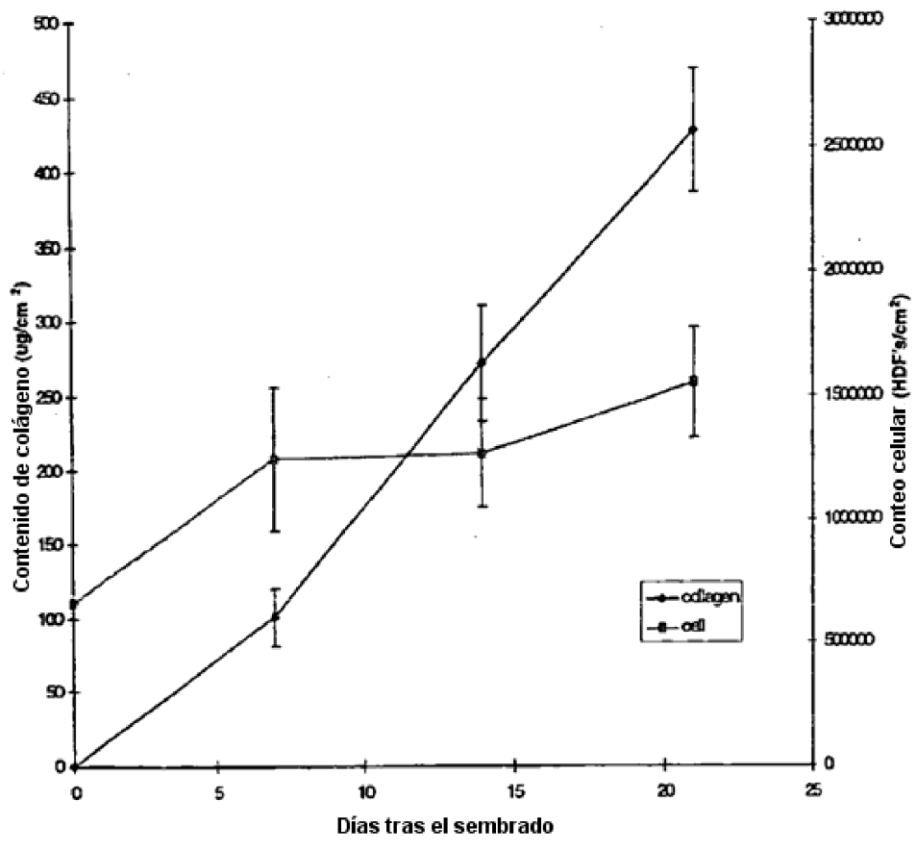
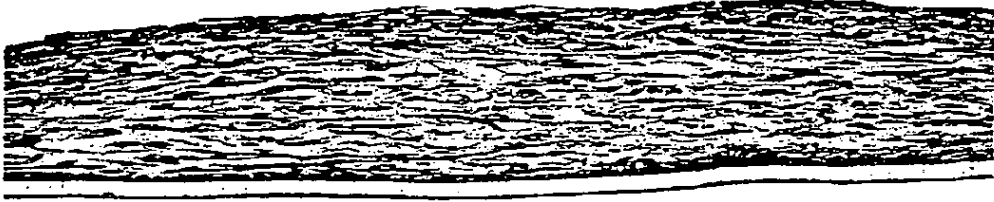


FIG. 1



**FIG. 2**

3A



3B



FIG. 3



**FIG. 4**