



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 277 338**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 35/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96203707 .3**

86 Fecha de presentación : **24.12.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0851028**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.1998**

54

Título: **Línea inmortalizada de células epiteliales humanas de la córnea.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

73

Titular/es: **Société des produits NESTLÉ S.A.**
Case Postale 353
1800 Vevey, CH

72

Inventor/es: **Offord Cavin, Elizabeth;**
Tromvoukis, Yvonne;
Pfeifer, Andrea M.A. y
Sharif, Naj

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Línea inmortalizada de células epiteliales humanas de la córnea.

5 La presente invención, tiene por objeto una nueva línea inmortalizada de células epiteliales humanas de la córnea, así como su utilización en procedimientos de identificación de agentes mutagénicos, tóxicos, o beneficiosos, para el metabolismo de las células de la córnea.

Estado actual de la técnica

10 Desde hace muchos años, se han realizado esfuerzos encaminados a desarrollar líneas celulares humanas, adaptadas al estudio de las enfermedades humanas, como las infecciones, las inflamaciones o los cánceres, por ejemplo. Entre las células implicadas, a menudo, en la aparición de enfermedades, se pueden contar las células epiteliales que son sensibles al entorno medioambiental del cuerpo humano.

15 Las células epiteliales, se distinguen de las otras células del cuerpo humano, por la expresión de compuestos o de estructuras encontradas únicamente en las células epiteliales, como por ejemplo, las citoceratinas (Moll *et al.*, Cell, 31, 11 - 24, 1982). Las conexiones entre las células (Gumbiner *et al.* Cell, 69, 385 - 387, 1992) y la vimentina (Richard *et al.*, Arch. Dermatol. 282, 512 - 515, 1990).

20 Se han encontrado igualmente otros compuestos, de una forma general, en las células epiteliales humanas, pero, no únicamente en las células epiteliales, como los citocromas P450 (Mercurio *et al.*, Biochem. Biophys. Research Communications, 210, n° 2, 350 - 355, 1995; McKinnon *et al.*, Gut, 36, 259 - 267, 1995), las enzimas implicadas en la defensa contra la oxidación celular (Cu/Zn-superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y catalasa: 25 Albers *et al.*, Toxicology and Applied Pharmacology, 109, 507 - 513, 1991) y / o en la destoxicación de electrofilos (glutatión-S-transferasa α , μ 6 π ; Singh *et al.*, Exp. Eye Res. 40 - 431 - 437, 1985; la aldehído reductasa: Ellis *et al.*, Biochemical J., 312, 535 - 541, 1995).

30 Las células epiteliales de la córnea humana, se distinguen igualmente de las otras células epiteliales humanas, por la expresión de compuestos que se encuentran únicamente en las células epiteliales de la córnea, como por ejemplo, la citoceratina de 64D y la glutatión-S-transferasa hGST 5.8, encontradas en los tejidos humanos oculares (hGST 5.8; Singhal *et al.*, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 32, 3073 - 3077, 1991).

35 El análisis de la expresión de ciertas citocinas y factores de crecimiento en las células epiteliales de la córnea humana, sin estimulación inflamatoria, ha sido ya determinada por parte de Cubitt *et al.*, Wilson *et al.*, Kennedy *et al.*, y De-Quan *et al.*, (J. Cellular Physiol. 163, 61 - 79, 1995; J. Clinical Investigation, 95, 82 - 88, 1995; Invest. Ophtha. Visual Sci., 33, 1756 - 1762, 1992; Invest. Ophtha. Visual Sci., 34, 3199 - 3210, 1993). Además, Rosenbaum *et al.*, han sugerido el hecho de que, el perfil en citocinas de las células de la córnea, podría ser un medio para detectar eficazmente la presencia de ciertas enfermedades de la córnea (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36, 2151 - 2155, 1995). 40 El perfil de expresión de ciertas citocinas y factores de crecimiento, en las células epiteliales de la córnea, permiten, por lo tanto, caracterizar y diferenciar las células epiteliales de córnea normales, de las otras células, y en particular, de las células epiteliales de córneas anormales.

45 Además, los procedimientos de cribado de moléculas no inflamatorias, para los ojos, recurren a animales de laboratorio. Para remediar el hecho de que subsisten diferencias sensibles, morfológicas y bioquímicas, entre los ojos humanos y los de los animales, Hainsworth *et al.*, proponen realizar estos tests de ensayo de cribado, sobre cultivos de células epiteliales primarias de córneas (J. Tissue Culture Meth., 13, 45 - 48, 1991). De una forma desafortunada, los cultivos de células primarias de córnea, dejan de multiplicarse, después de una o dos pasadas, consistiendo, cada pasada, en replicar las células en medio fresco, después del crecimiento, hasta la confluencia. Además, estas células 50 primarias, no sobreviven a una congelación en nitrógeno líquido.

Adicionalmente, además, para paliar estos inconvenientes, se han desarrollado líneas de células epiteliales humanas de córnea, por parte de Kahn *et al.* (Investigative Opht. & Visual Scie., 34, 3429 - 3441, 1993) y Araki-Sasaki *et al.* (Investigative Opht. & Visual Scie., 36, 614 - 621, 1995). Desafortunadamente, estas líneas, no son todavía plenamente 55 satisfactorias.

En efecto, las líneas desarrolladas por parte de Kahn *et al.*, no se encuentran completamente inmortalizadas, puesto que, éstas, conservan ciertas características de diferentes orígenes, hasta aproximadamente 25 pasadas sucesivas de cultivo (véase Kahn *et al.*). Estas líneas, liberan también el virus SV40, en el medio de cultivo (véase el análisis de 60 Araki-Sasaki *et al.*). Finalmente, no se sabe si éstas expresan efectivamente otros marcadores de diferenciación, tales como la glutatión-S-transferasa hGST5.8, y un perfil apropiado en citocinas y en factores de crecimiento, así como marcadores específicos o necesarios en una reacción inflamatoria.

Además, la patente estadounidense U.S. 5.585.265 (C.R. Kahn, J. Rhim), describe líneas de células epiteliales 65 humanas de córnea.

Las líneas inmortalizadas desarrolladas por Araki-Sasaki *et al.*, son por el contrario incapaces de estratificarse en ensayos de reconstrucción de córnea *in-vivo* (véase Araki-Sasaki *et al.*), y no se sabe si éstas expresan ciertos

marcadores de diferenciación, tales como la glutatión-S-transferasa hGST5.8, y un perfil apropiado en citocinas y en factores de crecimiento, así como marcadores específicos o necesarios para una reacción inflamatoria.

La finalidad de la presente invención, es la de pretender proporcionar una nueva línea de células epiteliales humanas de la córnea, que se acerca genéticamente y fisiológicamente a las células epiteliales normales de la córnea humana, hasta el punto que, ésta, pueda utilizarse eficazmente en ensayos de cribado de moléculas potencialmente inflamatorias.

Resumen de la invención

A dicho efecto, la presente invención, se refiere a la línea inmortalizada de células epiteliales humanas de córnea, que presenta el número de depósito CNCM I - 1777.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un nuevo procedimiento para identificar el efecto mutágeno, tóxico o beneficioso de un agente, sobre el metabolismo de las células de la córnea, en el cual (1), se hace reaccionar un cultivo que comprende una línea celular según la invención, con un agente sospechoso de ser un agente mutágeno, tóxico ó beneficioso para el metabolismo de las células de la córnea humana, y (2), se determinan los efectos del citado agente, sobre la citada línea celular.

La invención, se refiere asimismo a un equipo, a modo de “kit”, de diagnóstico, que comprende células epiteliales inmortalizadas de la córnea humana según la invención, y reactivos para determinar una respuesta metabólica de las citadas células, a los agentes mutagénicos, tóxicos o beneficiosos para las citadas células.

Finalmente, la invención, tiene también por objeto, todas las utilizaciones de la línea celular según la invención, en procedimientos de identificación de agentes mutagénicos, tóxicos o beneficiosos para el metabolismo de las células de la córnea, así como todas las utilizaciones de estas líneas en calidad de agente farmacéuticamente activo.

Descripción de las figuras

Figura 1:

Representación esquemática del plásmido pZiPSVU19, el cual se ha utilizado para preparar el vector p1/SV40U19, destinado a inmortalizar las células epiteliales primarias de la córnea humana.

Figura 2:

Porcentaje de acumulación de [3H] fosfoinosítidos mediante células epiteliales primarias de córnea humana y mediante las células CNCM, en función de la concentración de bradiquinina aplicada.

Figura 3:

Porcentaje de acumulación de [3H] fosfoinosítidos mediante células epiteliales primarias de córnea humana y mediante las células CNCM, en función de la concentración de histamina aplicada.

Figura 4:

Porcentaje de acumulación de [3H] fosfoinosítidos mediante células epiteliales primarias de córnea humana y mediante las células CNCM, en función de la concentración de PAF aplicada.

Descripción detallada de la invención

En el ámbito de la presente invención, las expresiones “células normales”, “células primaria” o “células no - inmortalizadas”, designan células epiteliales de la córnea humana, las cuales pueden extraerse sobre la córnea humana, que no presente deficiencias fisiológicas o genéticas que puedan presentar inconvenientes, y que pueden cultivarse durante un tiempo limitado, sin que éstas pierdan sus características de diferenciación original.

Por el contrario, la expresión “células inmortalizadas”, designa células que han seguido una manipulación genética, mediante la intermediación de una construcción de ADN, que las convierte en capaces de multiplicarse indefinidamente, es decir, a más de 25 pasadas, de una forma preferente, por lo menos 60 pasadas.

Así mismo, la palabra “pasada”, designa el proceso consistente en tomar un alícuoto de una célula confluyente o a saturación de una línea celular, en sembrar un medio fresco, y en cultivar la línea, hasta la confluencia o saturación. Las líneas celulares, se cultivan así, de este modo, de una forma tradicional, mediante pasadas sucesivas en medio fresco. Deberá tomarse debida nota, en cuanto al hecho de que, las líneas celulares, pueden perder sus características de diferenciación original, después de varias pasadas sucesivas. Es por lo tanto extremadamente ventajoso, el poder disponer de una línea, en donde, sus características, se conserven, incluso después de numerosas pasadas, de una forma preferente, por lo menos 30 a 60 pasadas.

Finalmente, la expresión “características de diferenciación original”, designa, a la vez, los marcadores encontrados específicamente sobre las células epiteliales humanas y los marcadores de diferenciación encontrados específicamente sobre las células epiteliales de la córnea humana.

5 La línea inmortalizada de células epiteliales de la córnea humana según la invención, no expresa marcadores tumorales, es decir, no presenta genes cancerígenos o no expresan ARN mensajeros (ARNm), proteínas, y/o estructuras celulares diferenciales características de la transformación de las células en células tumorales. Se puede detectar la presencia de estos marcadores, por hibridación o PCR de su ADN, con una sonda específica, mediante anticuerpos, y/o mediante microscopia electrónica, por ejemplo. La presencia de un marcador en una célula, no significa que la citada
10 célula sea susceptible de poder conferir un cáncer, después de algunos meses, a un ratón sin defensa inmunitaria, sino que, más bien traduce un estado transformado canceroso de las células, con relación a las células originales de las cuales éstas proceden.

15 La línea en concordancia con la presente invención, se encuentra también desprovista de virus, es decir que, ésta, es incapaz de producir los virus que la han inmortalizado inicialmente, como es el caso para las líneas desarrolladas por Kahn *et al.* (véase la introducción de Araki-Sasaki *et al.*).

20 La línea en concordancia con la presente invención, es capaz de estratificarse, es decir, capaz de organizarse en estratos sucesivos. Para ello, es suficiente con cultivar, hasta la confluencia, la línea en concordancia con la invención, en un medio sin suero, que comprenda 1,5 mM de CaCl y, a continuación, observar visualmente si las células se desarrollan en estratos, por ejemplo.

25 La línea según la invención, expresa, por el contrario, marcadores metabólicos específicos de células epiteliales humanas normales, es decir, marcadores encontrados generalmente en las células epiteliales.

Estos marcadores específicos, pueden ser un ARN mensajero (ARNm), una proteína, y/o una estructura celular diferenciada que puede proceder de células epiteliales de la piel, del ojo, del tracto intestinal, o del hígado, por ejemplo. Las células epiteliales humanas según la invención, expresan por lo menos dos marcadores elegidos entre el grupo formado por la vimentina, las citoceratinas, las conexiones entre las células (denominadas, en inglés “tight junctions”
30 -[empalme apretado]-), los citocromas P450, la glutatión-S-transferasa (GST), la Cu/Zn-superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GP), la glutatión-reductasa (GR), la catalasa (CA), y el aldehído reductasa (AR).

35 Se puede también notar que, la línea según la invención, puede expresar enzimas implicadas en la oxidación celular (SOD, GP, GR y CA) y/o la detoxificación de electrofilos (GST, AR). Esta línea, se encuentra también particularmente adaptada al estudio de fenómenos inflamatorios o de irritaciones de la córnea humana.

40 La línea celular según la invención, expresa también marcadores metabólicos de diferenciación, que son específicos de las células de la córnea, principalmente, de células epiteliales de la córnea humana (véase Reiners *et al.*, Carcinogenesis, 11, 957 - 963, 1990). Estos marcadores de diferenciación, pueden ser un ARNm, una proteína, o una estructura celular diferenciada.

45 La línea según la invención, expresa por lo menos 2 marcadores de diferenciación, elegidos entre el grupo formado por la citoceratina 64kD, la glutatión-S-transferasa hGST5.8, y un perfil en citocinas y en factores de crecimiento, que comprende los compuestos TNF α , IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, GM-CSF- β , IL-1 α , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF α , EGF, PDGF- β .

50 La línea según la invención, es igualmente capaz de expresar por lo menos un marcador específico de una reacción inflamatoria, es decir, una molécula que es detectable, cuando la célula reacciona a una estimulación inflamatoria y/o una molécula o una estructura que es necesaria para una reacción inflamatoria.

55 Las estimulaciones inflamatorias, pueden inducirse cuando se procede a poner en contacto las líneas según la invención, con un microorganismo de la especie *Pseudomonas aeruginosa* (Kernacki *et al.*, J. Ocul. Pharmacol., 10, 281 - 288, 1994), con el factor de activación de las plaquetas PAF (Bazan *et al.*, Exp. Eye Research, 14, 769 - 775, con 12-O-tetradecanoilforbol (TPA: tumor promoting agent - [agente promotor de tumor]-), con la histamina (Sharif *et al.*, J. Ocular Pharmacol., 10, 653 - 664, 1994), con la bradiquinina (Sharif *et al.*, Neurochem. Int. 18, 89 - 96, 1991), o con otros compuestos inflamatorios, por ejemplo.

60 La colagenasa I, es un marcador fácilmente detectable, cuando una línea, se somete a una estimulación inflamatoria (Bazan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8678 - 8682, 1993). Otros marcadores, pueden también detectarse, como el c-fos (véase Bazán y al.), los intermediarios araquidónicos 12-HETE y 12-HETrE (Corners *et al.*, Inves. Ophth. & Visu. Sci., 36, 828 - 840, 1995) o un nuevo perfil en citocinas y en factores de crecimiento, por ejemplo.

65 La línea según la invención, es igualmente capaz de expresar por lo menos un marcador necesario para una reacción inflamatoria, como por ejemplo, el receptor de bradikina, el receptor de histamida, el receptor de PAF, el sistema de transducción de una señal mediante los fosfolípidos (Phosphoinositide turnover signal transduction pathway - [Trayectoria de transducción de señal de volumen de Fosfoinosítido]-; Sharif *et al.*, Neurochem. Res. 12, 1313 - 1320, 1993).

La invención, se refiere, de una forma más particular, a una línea inmortalizada según la invención, y a ha sido depositada, según el tratado de Budapest, en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724, París, el 22 de Octubre de 1996, en donde, ésta, recibió el número de depósito CNCM I - 1777.

La línea según la invención, conserva sus características de diferenciación original, incluso después de numerosas pasadas, especialmente, por lo menos 25 pasadas, de una forma preferente, por lo menos 30 a 100 pasadas.

Para obtener la línea según la invención, se puede preparar un cultivo de células epiteliales primarias procedentes de la córnea humana, infectar el cultivo con un virus recombinante, y cultivar las células inmortalizadas en un medio de cultivo sin suero. A dicho efecto, la persona experta en el arte especializado de la técnica, dispone de numerosos medios de cultivo sin suero. A título de indicación, se pueden citar los medios sin suero, descritos por parte de Gibson *et al.* (Gut, 35, 791 - 792, 1991), Pfeifer *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5123 - 5127, 1993), Kulkani *et al.* (Carcinogenesis, 16, n° 10, 2515 - 1521, 1995), o en la patente europea EP 96 201 064,1 y la patente estadounidense US 08/576483, por ejemplo. Un medio sin suero perfectamente adaptado a las necesidades de este procedimiento, es el medio KGM (Clonetics, US).

La línea según la invención, se ha obtenido poniendo en práctica las etapas siguientes:

(1) se obtiene una muestra de tejidos epiteliales de una córnea humana;

(2) se prepara esta muestra en vistas a su cultivo *in-vitro*;

(3) se siembran las células epiteliales en un medio de cultivo sin suero, y sobre placas de cultivo que comprenden un revestimiento que facilita la unión de las células a su crecimiento.

(4) se cambia el medio, tantas veces que sea necesario, para optimizar el crecimiento confluyente;

(5) se infectan las células, con un virus recombinante;

(6) se cultivan las células inmortalizadas, en un medio de cultivo sin suero.

De una forma más en detalle, la etapa 1), se refiere a la obtención de muestras de células de la córnea de individuos normales, en el momento de actos de cirugía. En la etapa 2), se puede lavar la muestra en el medio de cultivo, cortarlo en pedazos, separar la parte epitelial de los otros tejidos, mediante medios físicos y/o químicos. Así, por ejemplo, se pueden emplazar los pedazos de tejidos, en una solución que comprenda una proteasa, durante un transcurso de tiempo que sea suficiente, como para llegar a separar las células.

En la etapa 3), se pueden sembrar las células epiteliales, en un medio de cultivo sin suero, presentando, las placas de cultivo, un revestimiento constituido por una solución gelatinizada, a un 0,01 - 1%, por ejemplo.

En la etapa 4), el medio de cultivo que contiene las células epiteliales, se cambia tantas veces que como sea necesario, para optimizar un crecimiento confluyente. De una forma preferente, el medio de cultivo, se reemplaza cada dos días. Después de haber alcanzado una confluencia del orden de un 90%, de la superficie disponible, lo cual sucede, generalmente, en un transcurso de tiempo de 10 a 14 días, después de la siembra, las células, se separan mediante tratamientos en una solución de proteasa.

Las células separadas, se transfieren a la etapa 5), en un medio de cultivo fresco y, después, se procede, a continuación, a infectar las células, de una forma clásica, mediante un virus recombinante. Son numerosas, las técnicas de transfección que se encuentran a disposición de la persona experta en el arte especializado de la técnica. A título de ejemplo, se pueden citar las técnicas descritas en el documento de patente internacional WO 96/07 750, por parte de Claudia Chen *et al.* (Mol. and Cell. Biol., 7, 2745 - 2752, 1987) o por parte de Wilson *et al.* (Analytical Biochemistry, 226, 212 - 220, 1995).

De una forma preferente, se utiliza un virus recombinante SV40, que comprende el Antígeno T (Ag-T), un origen de replicación de virus inactivado, y un gen de selección. A título de ejemplo, se puede utilizar la construcción de ADN pLXSHD+SV40+, descrita por parte de Stockshlaeder, y cuya secuencia, se encuentra disponible en el banco de datos GenBank (n° de acceso M64753; Human Gen. Therapy, 2, 33 - 39, 1991).

Otros vectores apropiados, pueden también construirse fácilmente, contruidos por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica, a partir de vectores disponibles comercialmente que comprenden el gen que codifica para el Ag-T, un gen de selección y/o un origen de replicación de virus inactivado. A título de ejemplo, se puede preparar la construcción p1/SV40U19, creando sitios BamHI en los extremos del fragmento Bgl-HpaI de SV40, y clonando este fragmento en el sitio BamHI del plásmido pZIPSU19, descrito en la figura 1 que se facilita posteriormente, más abajo, y por Jat *et al.*, Mol. Cell. Biol., 9, 1672, 1691, 1989.

En la etapa 6), se transfieren las células epiteliales en un medio de crecimiento fresco, sobre placas de cultivo que tengan el revestimiento descrito anteriormente, arriba.

Conociendo las propiedades nuevas y originales de la línea de células epiteliales según la invención, se puede pretender su aplicación en estudios inmunológicos, farmacológicos y toxicológicos.

La línea según la invención, se encuentra de este modo particularmente adaptada para cribar agentes mutagénicos, tóxicos o beneficiosos, para el metabolismo de las células de la córnea, por ejemplo, en un procedimiento, en el cual (1) se hace reaccionar, se cultiva o se pone en contacto, con un cultivo que comprende la línea celular según la invención, una agente sospechoso de ser un agente mutante, tóxico o beneficiosos para el metabolismo de las células de la córnea, y (2), se determinan o se miden los efectos del citado agente, sobre la citada línea celular.

Se puede por lo tanto pretender, igualmente, el preparar un equipo de diagnóstico, a modo de "kit", que comprenda las células epiteliales según la invención, y reactivos, para determinar una respuesta metabólica de las citadas células a agentes mutagénicos, tóxicos o beneficiosos.

La línea según la invención, se encuentra también adaptada a la expresión de proteínas recombinantes. Los procedimientos de transfección de ADN extraño, son ahora bien conocidas por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica (véase, por ejemplo, el documento de patente internacional WO 94/05 472).

La línea según la invención, tiene también una utilidad potencial en la terapia genética *ex-vivo*. Esta línea, podría constituir en efecto un útil apropiado para desarrollar células recombinantes que expresen genes de interés, en vistas a una aplicación terapéutica. Una ventaja presentada adicionalmente por parte de la línea según la invención, es que, ésta, no se expone a un suero animal, lo cual reduce considerablemente los riesgos de contaminación potenciales por virus u otros agentes patógenos.

La presente invención, se describe en más detalle, a continuación, con la ayuda de la descripción que seguirá, la cual se refiere a ejemplos de preparación de la línea celular según la invención. El cultivo de líneas celulares, la preparación de vectores SV40, la transfección, la preparación de sondas y de cebadores de ADN, y el análisis de las expresiones de los marcadores, se efectúan, en ausencia de precisiones contrarias, según los protocolos descritos en las referencias citadas anteriormente, arriba, y en los de la obra de Sambrook *et al.*, (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, - Clonación molecular, Un manual de laboratorio -, Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989). Los porcentajes, se proporcionan en peso, salvo indicación contraria.

Ejemplo 1

Se construye el plásmido p1/SV40U19, creando sitios BamHI en los extremos del fragmento BglI-HpaI de SV40, y clonando este fragmento en el sitio BamHI del plásmido pZIPSU19, descrito por parte de Jat. *et al.*, Mol. Cell. Biol. 9, 1672 - 1681, 1989. A título de indicación, el vector pZIPSU19, representado esquemáticamente en la figura 1, comprende el marcador de selección neomicina y el LTR del virus Moloney.

Se prepara el virus SV40 según una versión modificada del protocolo de Lynch et Miller (J. Virol., 65, 3887 - 3890, 1991). Para ello, se cultivan las líneas celulares ecotrófica Psi2 (Mann *et al.*, Cell, 33, 153 - 159, 1983) y anfotrófica PA317 (ATCC CRL9078) en el medio DMEM (Dulbecco, USA), que comprende un 10% de suero bovino fetal, a una temperatura de 37°C, y bajo una atmósfera que comprende un 5% de CO₂. Se procede a transfectar, de una forma clásica estas líneas, de una forma separada, utilizando 250 mM de CaCl₂ y 10 µg del plásmido p1/SV40U19, éstos se someten a un tratamiento con tripsina después de 48 horas de incubación, éstos se mezclan en cantidad igual, y se incuba la totalidad, a una temperatura de 37°C, bajo una atmósfera que comprende un 5% de CO₂. Después de crecimiento hasta un 80% de confluencia, se procede a recolectar el virus, en el medio sin suero KGM-1 (= medio KBM de Clonetics, US, que comprende, además, 0,15 mM de CaCl₂, 30 µg/ml de extracto de glándula pituitaria bovina, 0,5 µg/l de hidrocortisona, 5 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de transferina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico murino (múrido) (EGF), 10000 U/ml de penicilina y 10000 U/ml de estreptomycin). Después de filtración (0,45 µg, Micropore), se determina la cantidad de virus sobre las células NIH 3T3 (ATCC CRL 1658).

Se obtuvieron células epiteliales de córnea, como consecuencia de la biopsia del ojo de un donante de 73 años, fallecido de un infarto de miocardio. Se procede a lavar la muestra, en el tampón de fosfato PBS, ésta se trata a una temperatura de 4°C, durante un transcurso de tiempo de 24 horas, con 10 U/ml de dispasa II (Boehringer Mannheim, n° 295825), en un tampón que comprende 50% de medio KMG-2 (= KBM + 0,05 mM de CaCl₂, 30 µg/ml de extracto de glándula pituitaria bovina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico murino, 0,5 µg/ml de hidrocortisona, 0,05 µg/ml de anfotericina B, 5 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de transferina, 50 µg/ml de gentamicina). Después de incubación, se procede a separar manualmente las células, éstas se lavan con el medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, - [Medio Eagle modificado de Dulbecco] -, US), que comprende un 10% de suero bovino fetal, éstas se centrifugan, se recogen las tortas en el medio KGM-2, éstas se distribuyen sobre placas de cultivo, previamente preincubadas en una solución de 0,1% de gelatina A (Sigma G2500). Se procede a incubar las placas, a una temperatura de 37°C, bajo una atmósfera que comprende un 100% de humedad relativa, un 95% de oxígeno y un 5% de dióxido de carbono. El medio de cultivo que comprende las células epiteliales, se cambia tantas veces como sea necesario, para optimizar un crecimiento confluyente.

Después de haber alcanzado una confluencia del orden de un 90%, después de un tiempo de 2 semanas de cultivo, las células, se separan de una forma clásica, mediante tratamientos, en una solución de dispasa II. Las células separadas, se transfieren, a continuación, en medio KGM-1 y en placas de cultivo preincubadas, con una solución de

0,1% de gelatina A. Los cultivos, se infectan, a continuación, en presencia de 8 $\mu\text{g/ml}$ de polibreno, y un alto título de virus recombinante SV40 (10^5 - 10^7 CFU), preparado de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba. Después de un tiempo de 2 horas de incubación con el virus, se procede a lavar los cultivos, en PBS, y se cultivan las células, mediante pasadas sucesivas en el medio fresco KGM-1, teniendo cuidado, en cada pasada, de lavar sucesivamente las células, en un tampón HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, Biofluids n° 325); separarlas mediante un tratamiento durante un transcurso de tiempo de 1 - 2 horas, a 37°C, en una solución que comprende 2,4 U/ml de dispasa II, 50% de tampón HBSS y 50% de medio KBM; recolectarlas, en medio KBM; centrifugarlas; recoger la torta en el medio KBM; y después, distribuir las células, sobre nuevas placas frescas.

Mediante pasadas sucesivas, se procedió a purificar las células transformadas de las células epiteliales primarias. A continuación, diluyendo en un medio de cultivo, las células transformadas, previamente separadas mediante dispasa II, se pudieron seleccionar 9 líneas inmortalizadas, individualizadas, de células epiteliales de la córnea humana, de las cuales, una de ellas, se depositó, según el tratado de Budapest, en la Collection National de Cultures de Microorganismes, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 París, el 22 de Octubre de 1996, en donde, ésta, recibió el número de registro CNCM I - 1777.

1. Análisis del cariotipo de cepa CNCM I - 1777

Se procedió a realizar el análisis de la cepa CNCM I - 1777, por parte del "Children's Hospital of Michigan", 3901 Beaubien, Detroit, en conformidad con el procedimiento descrito por parte de Stuffer *et al.* (The American Journal of Surgery, 169, 190 - 196, 1995). No es visible ninguna formación de tumor, después de varios meses.

2. Tumorigenicidad de la cepa CNCM I - 1777

Se procede a inyectar 10^7 células de la línea CNCM I - 1777, extraída, en la 33ª pasada, a ratones sin defensa inmunitaria ("nude"), según el protocolo descrito por parte de Stuffer *et al.* (The American Journal of Surgery, 169, 190 - 196, 1995). No es visible ninguna formación de tumor, después de varios meses.

4. Contaminación vírica de la línea CNCM I - 1777

Se determina si la línea CNCM I - 1777, se encuentra contaminada, por el virus de la hepatitis C (HVC), el virus de la hepatitis B (HBV) y el virus del sida (HIV-1). Los resultados de las experiencias, las cuales se describen posteriormente, a continuación, son negativos, para la presencia de los 3 virus.

Para el análisis del HBV, se procede a extraer el ADN, a partir de aproximadamente 2×10^6 células por tratamiento, en soluciones de fenol y cloroformo, seguido de una precipitación en etanol. Se procede, a continuación, a someter muestras de ADN, a una amplificación por PCR, utilizando cebadores específicos de la región pre-núcleo del virus (Lynch *et al.*, J. Vir., 65, 3887 - 3890). Se procede, a continuación, a separar los productos de la amplificación, sobre gel de agarosa, y éstos se visualizan bajo U.V. en presencia de bromuro de etidio. A efectos de comparación, se analiza, de la misma forma, en paralelo, una dilución de un suero que contiene $10 - 10^5$ HBV (Anawa Biomedical Services 6 Product, USA).

Para el análisis del HIV-1, se someten las muestras de ADN descritas anteriormente, arriba, a una amplificación por PCR, utilizando cebadores específicos de la región GAG del virus. Se procede, a continuación, a separar los productos de la amplificación, sobre gel de agarosa, y éstos se visualizan en U.V. en presencia de bromuro de etidio. A efectos de comparación, se analiza, de la misma forma, en paralelo, una dilución de un suero que contiene $10 - 10^5$ HIV-1 (Anawa Biomedical Services 6 Product, USA).

Para el análisis del HCV, se procede a extraer el ARN, a partir de aproximadamente 2×10^6 células, mediante el procedimiento de Chomczynski *et al.* (Anal. Biochem., 162, 156 - 159, 1987). Se procede a efectuar una "reverse-transcription" (transcripción inversa) de una forma clásica y, el ADN complementario, se somete a una amplificación por PCR, utilizando cebadores específicos de la región 5' no codificante del virus. Se procede, a continuación, a separar los productos de la amplificación, sobre gel de agarosa, y éstos se visualizan bajo U.V. en presencia de bromuro de etidio. A efectos de comparación, se analiza, de la misma forma, en paralelo, una dilución de un suero que contiene $10 - 10^5$ HCV (Anawa Biomedical Services 6 Product, USA).

5. Marcadores específicos de células epiteliales humanas, mediante la línea CNCM I - 1777

5.a. Citoceratinas

Se procede a fijar las células de un cultivo de la línea CNCM I - 1777, tomado en la 22ª pasada, sobre placas cristal, mediante una solución de 100% metanol frío y, a continuación, se procede a lavar las placas, en un tampón que comprende 0,05 M de Tris pH 8,6, 1,8% de NaCl, y 0,2% de polietilenglicol 2000 (tampón TNP). Se procede, a continuación, a incubar las células, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, en presencia de anticuerpos de ratones específicos para ciertas citocinas (anti-CH péptido 4, 7, 8, 13, 14, 17, 18, 19, 20: Sigma y Boehringer). Después de 3 lavados, en el tampón TNP que comprende 0,5% de BSA, se procede a incubar las placas, durante un tiempo 60 minutos, con un anticuerpo de cabra anti IgG, de ratones, que comprende un compuesto inmunofluorescente (1:300,

FITC-goat anti mouse IgG; Biosys). Después de 3 lavados en el tampón precedente, se procede a fijar las placas, y éstas se analizan, mediante fluorescencia, bajo microscopio. Todas las células son positivas para las citoceratinas 4, 7, 8, 13, 14, 17, 18, 19.

5.b. *Vimentina*

Se procede a fijar las células de un cultivo de la línea CNCM I - 1777, tomado en la 22ª pasada, de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba. Después, se procede a someter las células fijadas, a un anticuerpo de ratones anti-vimentina (DAKO, USA) y, a continuación, al anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón, anteriormente mencionado, arriba. Bajo microscopio, mediante fluorescencia, todas las células son positivas, para la vimentina.

5.c. *Conexiones entre las células*

Se procede a cultivar las células de la línea CNCM I - 1777, tomada en la 22ª pasada, sobre placa de vidrio, hasta confluencia, éstas se fijan mediante tratamiento con una solución de 2,5% de glutaraldehído, en un tampón de fosfato 0,1 M pH 7,4, durante un tiempo de 1 hora, a la temperatura ambiente. Después de dos lavados, en el mismo tampón fosfato, se procede a fijar, de nuevo, las células, en una solución de 2% OSO_4 , en el mismo tampón. Se procede, a continuación, a deshidratar las células, en soluciones sucesivas de etanol, a 30, 50, 70, 90 y 100% (Polaron Equipment Ltd., Watford, UK) y, a continuación, se recubren las células mediante una capa fina de oro (SEM coating unit E5100, Polaron). Se procede, a continuación, a examinar las células, bajo microscopio electrónico (Philips 505 SEM). El análisis, revela el hecho de que, las células, presentan conexiones inter-celulares, que son características de las células epiteliales (en inglés, "tight junctions").

5.d. *Citocroma P450*

Se procede a analizar la expresión de los citocromas, mediante las células de la línea CNCM I - 1777, tomada en la 30ª pasada, con la ayuda de la técnica conocida como RT-PCR, utilizando cebadores de ADN específicos de los diferentes citocromas P450. Estos cebadores, se prepararon de una forma clásica, a partir de las secuencias de ADN de diferentes citocromas que son accesibles sobre la base de datos GeneBank (CYP1A1: n° de acceso X02612; CYP2C: n° de acceso M61855 ó M61858 ó M61856 ó MM61854; CYP2D6: n° de acceso M33388; CYP1A2: n° de acceso Z00036).

Para realizar este cometido, se procede a cultivar las células hasta confluencia, sobre cajas de 35 mm (Costar), se extrae el ARN, con la ayuda del equipo, a modo de "kit", RNeasy (Qiagen), se efectúa una transcripción inversa (1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, Boehringer Mannheim), se somete el ADN complementario obtenido a una amplificación por PCR, procediendo a utilizar cebadores de ADN específicos de los diferentes citocromas P450, se separan, a continuación, los productos de amplificación sobre gel de agarosa, y éstos se visualizan bajo U.V., en presencia de bromuro de etidio. Los resultados, muestran el hecho de que, las células CNCM I - 1777, expresan los citocromas CYP1A1, CYP1A2, CYP2C, CYP2D6.

5.e. *Enzimas implicadas en la oxidación celular y la detoxificación de electrofilos*

Se procede a cultivar las células de la línea CNCM I - 1777, tomada en la 30ª pasada, se extrae el ARN mediante el procedimiento de Chomczynski *et al.* (Anal. Biochem., 162, 156 - 159, 1987), a continuación, se efectúa un Northern-blot (transferencia Northern) de este ARN, con sondas de ADN que codifican parcialmente para la Cu/Zn-superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GP), la catalasa (CA) y la glutatión-S-transferasa π (GST π). Las sondas de ADN, se preparan de una forma clásica, a partir de las secuencias de ADN de los genes que codifican para estas enzimas, que se encuentran disponibles en la base de datos GeneBank (GST π : n° de acceso X08058; GP: n° de acceso M21304; CA: n° de acceso M81578; SOD: n° de acceso 729336). Los resultados de estos ensayos, muestran el hecho de que, todas las células, expresan una transcripción de los genes que codifica para la actividad SOD, GP, CA, y GST π .

Además, la expresión de la glutatión reductasa, se confirma, igualmente, mediante el test de ensayo enzimático descrito por parte de Gondhowiardjo (Cornea, 12, 310 - 314, 1993). La actividad catalasa, se confirma, también, mediante el test de ensayo enzimático descrito por parte de Aeby *et al.* (Method and Enzymology, 105, 121 - 126, 1984). Finalmente, la actividad aldehído reductasa, se evidencia, también, mediante el test de ensayo enzimático, descrito por parte de Ellis *et al.* (Biochemical Journal, 312, 535 - 541, 1995).

6. *Marcadores específicos de células epiteliales de la córnea para la línea CNCM I - 1777*

6.a *Expresión de la citocerina de 64 kD*

Tal y como para el análisis de las citocerinas, descrito anteriormente, arriba, se procede a fijar las células sobre placas en vidrio, mediante una solución de 100% metanol frío, a continuación, se lavan las placas en el tampón de TNP (véase anteriormente, arriba). Se procede, a continuación, a incubar las células, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, en presencia de anticuerpo de ratones específicos para la citocerina de 64 kD (Anticuerpo AE5, ICM Biomedical Inc., US). Después de 3 lavados en el tampón TNP, que comprende un 0,5% de BSA, se procede a incubar las placas, durante un tiempo de 30 minutos, con un anticuerpo de cabra anti IgG de ratones, que comprende un compuesto inmunofluorescente (1 : 300, FITC-goat anti mouse IgG; Biosys). Después de 3 lavados en

el tampón precedente, se procede a fijar las placas, y éstas se analizan para fluorescencia, al microscopio. Las células, son positivas para la citoceratina de 64 kD.

6.b. Expresión de la glutatión-S-transferasa hGST5.8

Se procede a analizar la expresión de la glutatión-S-transferasa hGST5.8, por mediación del test de ensayo descrito por parte de Singhal *et al.* (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36, 142 - 150, 1995). En resumen, se procede a mezclar 10 µg/ml de un extracto citosólico de la línea CNCM I-1777, con 0,1 mM de 4-hidroxi-nonenal y 0,5 mM de glutatión, en un tampón de fosfato de potasio 100 mM a un pH 6,5 y, a continuación, se procede a medir la actividad enzimática mediante el cambio de absorción de la mezcla, a 224 nm. Los resultados obtenidos, muestran el hecho de que, la línea CNCM I-1777, expresa una actividad glutatión-S-transferasa hGST5.8.

6.c. Perfil de expresión de las citocinas y de los factores de crecimiento

Se procede a cultivar las células de la línea CNCM I - 1777, tomada en la 30ª pasada, se extrae el ARN y, a continuación, se efectúa una PCR sobre este ARN, con diferentes cebadores, para confirmar la transcripción de los ARN que codifican para las citocinas y/o los factores de crecimiento siguientes: TNFα, IL-1β, IL-1α, IL-6, IL-8, GM CSF-β, IL-ra, TGF-β1, TGF-β2, TGFα, EGF, PDGF-β.

Estos cebadores, corresponden a una parte de los genes que codifican para estos compuestos, siendo accesibles, las secuencias de ADN de los citados compuestos, en la base de datos GeneBank (nº de acceso TNFα: X02910; IL-1β: M15840; IL-1α: M15329; IL-6: M14584, Rosenbaum *et al.*, Inv. Oph & Vi. Sc., 36, 2151-2155; 1995; IL-8: M28130; GM CSF-β: X03021; IL-ra: M97748, Kennedy *et al.*, J. Clinical Inv. 95, 82 - 88; 1995; TGF-β1: X02812, Nishida *et al.*, Curr. Eye Res., 14, 235 - 241; 1995; TGF-β2: Y00083; TGFα: M22440; EGF: L17032; PDGF-β: X02811).

A efectos comparativos, se efectúa el mismo análisis del perfil de expresión de las citocinas y de los factores de crecimiento, sobre ARN procedente de tejidos epiteliales de la córnea humana (4 biopsias diferentes).

Los resultados se presentan en la tabla 1 que se facilita abajo, a continuación. El signo *, indica el hecho de que, la expresión de los compuestos IL-1β, TNFα, IL-1α, IL-6 e IL-8, ha sido confirmada, igualmente, mediante los tests de ensayo ELISA, a partir del medio de cultivo de las células CNCM I - 1777. Los anticuerpos específicos de estas diferentes citocinas, se encuentran comercialmente disponibles en el comercio (IL-1β, TNFα: BioSource Inter. US, nº de catálogo KHC0012 y KHC3013; IL-1α, IL-6 e IL-8: CLB corp., US, nº de catálogo M1901, M1916, M1918).

TABLA 1

citocinas y factores de crecimiento	CNCM I-1777	Biopsia 1	Biopsia 2	Biopsia 3	Biopsia 4
TNFα*	+	+/-	+/-	+/-	+/-
IL-1β *	+++	+	++	+	++
IL-1α*	+++	+/-	++	+	+++
IL-6 *	++	+	+	-	-
IL-8 *	+++	+/-	+	+	++
GM CSF-β	++	+/-	+/-	+/-	+/-
IL-ra	++	+	+++	++	+
TGF-β1	+++	+	++	+	++
TGF-β2	+++	+	++	++	++
TGFα	+++	+	++	+	++
EGF	+++	+	++	++	+++
PDGF-β	+	+/-	+/-	+/-	+/-
(-: no detectado; +/-: débilmente detectado; +++: abundante)					

7. Marcadores específicos de una reacción inflamatoria mediante la línea CNCM I-1777

7.a. Colagenasa

La colagenasa I; es una molécula, cuya expresión, caracteriza un estado normal de inflamación de las células de la córnea. Se puede detectar la expresión de la colagenasa, mediante PCR, mediante Western-Blot o mediante ELISA.

ES 2 277 338 T3

Para detectar la collagenasa I mediante PCR, se procede a cultivar las células CNCM I-1777, tomadas en la 29ª pasada, en presencia de 20 ng/ml de TPA, durante un transcurso de tiempo de 16 a 24 horas, se extrae el ARN, y se detecta la presencia de ARNm de collagenasa I, mediante PCR, con un cebador derivado de la secuencia de ADN de la collagenasa I (GeneBank: n° X05231).

Para detectar la collagenasa I mediante Western-Blot, después de haber cultivado las células CNCM I - 1777, en presencia de 20 ng/ml de TPA, durante un transcurso de tiempo de 16 a 24 horas, se procede a recuperar el medio de cultivo, éste se concentra con un filtro Amicon 30®, se separan las proteínas por electroforesis sobre un gel de poliacrilamina SDS-Page, éstas se transfieren mediante transferencia de Western-blot sobre un filtro, se somete el filtro a un primer anticuerpo anti-collagenasa I (Cortex Biochem, US n° 60338P), a un segundo anticuerpo acoplado a una peroxidasa (Pierce, US, n° 31400) y, a continuación, al sustrato de la peroxidasa.

Para detectar la collagenasa I mediante Elisa, es suficiente con utilizar el equipo, a modo de “kit”, hMMP-1, de Amersham (catálogo, rpn 2610), siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Los resultados, muestran que se puede detectar la expresión de collagenasa I, cuando las células CNCM I - 1777, se someten a un tratamiento inflamatorio. Por el contrario, cuando las células CNCM I - 1777, no se ponen en contacto con TPA, éstas no expresan collagenasa I detectable por PCR, Wesrtern-Blot o Elisa.

7.b. Marcadores necesarios para una reacción inflamatoria

Los receptores a la bradiquinina, a la histamina, al PAF, y el sistema de transducción de los fosfoinosítidos, son marcadores indispensables para que la línea CNCM I - 1777, pueda encontrarse fisiológicamente en un estado normal de inflamación. Para detectar la presencia de estos marcadores, se procede a incubar las células CNCM I - 1777, o células epiteliales primarias de la córnea humana, en presencia de compuestos inflamatorios que se supone que interactúan con receptores acoplados con el sistema de transducción de señales inflamatorias mediante los fosfoinosítidos, y se mide la concentración de moléculas de fosfato de inositol (PI) de esta forma producidos. La acumulación de PI, es de hecho característica de la existencia de receptores, a los compuestos inflamatorios.

Los ensayos, se basan en los protocolos de Sharifs *et al.*, descritos en J. Ocular Pharmacol., 10, 653 - 664, 1994; y Neurchem Res., 12, 1313 - 1320. En resumen, sobre dos placas que comprenden 24 hoyos, se cultivan en el medio DNEM, aproximadamente $2,5 \times 10^5$ células CNCM I - 1777, por hoyo, en presencia de [³H] mio-inositol (1 µl Ci/0,5 ml; 5 -17 Ci/mM, Anersham Corp.), durante un transcurso de tiempo de 24 horas, a una temperatura de 37°C. Se procede a aspirar el medio de los hoyos, y éstos se exponen, durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, a una temperatura de 37°C, a un medio DMEM que comprende 1 mM de LiCl, 15 mM de tampón HEPES, y diferentes concentraciones de bradiquinina (Collaborative Biomedical, US), de histamina (Sigma US) o de PAF (BioMol Research Lab, US). Para parar la reacción, se procede, a continuación, a aspirar el medio, y se añade, en los hoyos, 0,1 M de ácido fórmico. Después de ello, se procede a lisar las células, se separan los compuestos de lisado sobre una columna de intercambio de iones (resina AG1x8; columna Econo®, Biorad US), eluyendo la columna con 10 ml de agua desionizada, y 8 ml de una solución de 50 mM de formiato amónico, y se procede a cuantificar la radioactividad liberada por las fracciones de elución, con un contador de centelleo.

Los resultados, se analizan según el procedimiento descrito por Sharif *et al.* (Neurochem. Int. 18, 89 - 96, 1991). El valor EC50, define la concentración de compuesto requerida par estimular un 50% del máximo de actividad del sistema de transducción de los fosfoinosítidos.

Los resultados, los cuales de presentan en las figuras 2, 3 y 4, muestran el hecho de que, las células CNCM I - 1777, presentan receptores a la bradiquinina, a la histamina, al PAF, y que, éstas, se comportan como células epiteliales primarias de la córnea humana.

Ejemplo 2

Tal y como se describe en el ejemplo 1, se procede a analizar la capacidad de la línea CNCM I - 1777, extraída en la pasada 106, para expresar marcadores metabólicos específicos de las células epiteliales humanas, no inmortalizadas, marcadores metabólicos de diferenciación específicos de la células epiteliales, no inmortalizadas, de la córnea humana, y marcadores de una reacción inflamatoria. Los resultados, son comparables a los presentados en el ejemplo 1.

REIVINDICACIONES

5 1. Línea inmortalizada de células epiteliales humanas de córnea, capaces de estratificarse, y capaces de expresar marcadores metabólicos específicos de las células epiteliales humanas no inmortalizadas, marcadores metabólicos de diferenciación, específicos de las células epiteliales no inmortalizadas de la córnea humana, y marcadores específicos de una reacción inflamatoria, presentando, la citada línea inmortalizada, el número de depósito CNCM I - 1777.

10 2. Procedimiento para identificar el efecto mutágeno, tóxico o beneficioso de un agente, sobre el metabolismo de las células de la córnea, en el cual (1), se hace reaccionar un cultivo que comprende una línea celular según la reivindicación 1, con un agente sospechoso de ser un agente mutágeno, tóxico ó beneficioso para el metabolismo de las células de la córnea humana, y (2), se determinan los efectos del citado agente, sobre la citada línea celular.

15 3. Equipo, a modo de "kit", de diagnóstico, que comprende las células epiteliales inmortalizadas de la córnea humana según la reivindicación 1, y reactivos para determinar una respuesta metabólica de las citadas células, a agentes mutagénicos, tóxicos o beneficiosos.

20 4. Utilización de las células epiteliales inmortalizadas de la córnea humana, según la reivindicación 1, en procedimientos de identificación de agentes mutagénicos, tóxicos o beneficiosos para el metabolismo de las células de la córnea.

5. Utilización de las líneas epiteliales inmortalizadas de la córnea humana según la reivindicación 1, en calidad de agente farmacéuticamente activo.

Fig 1

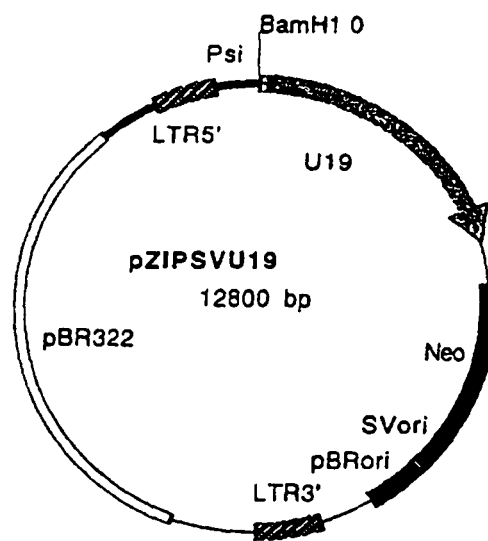
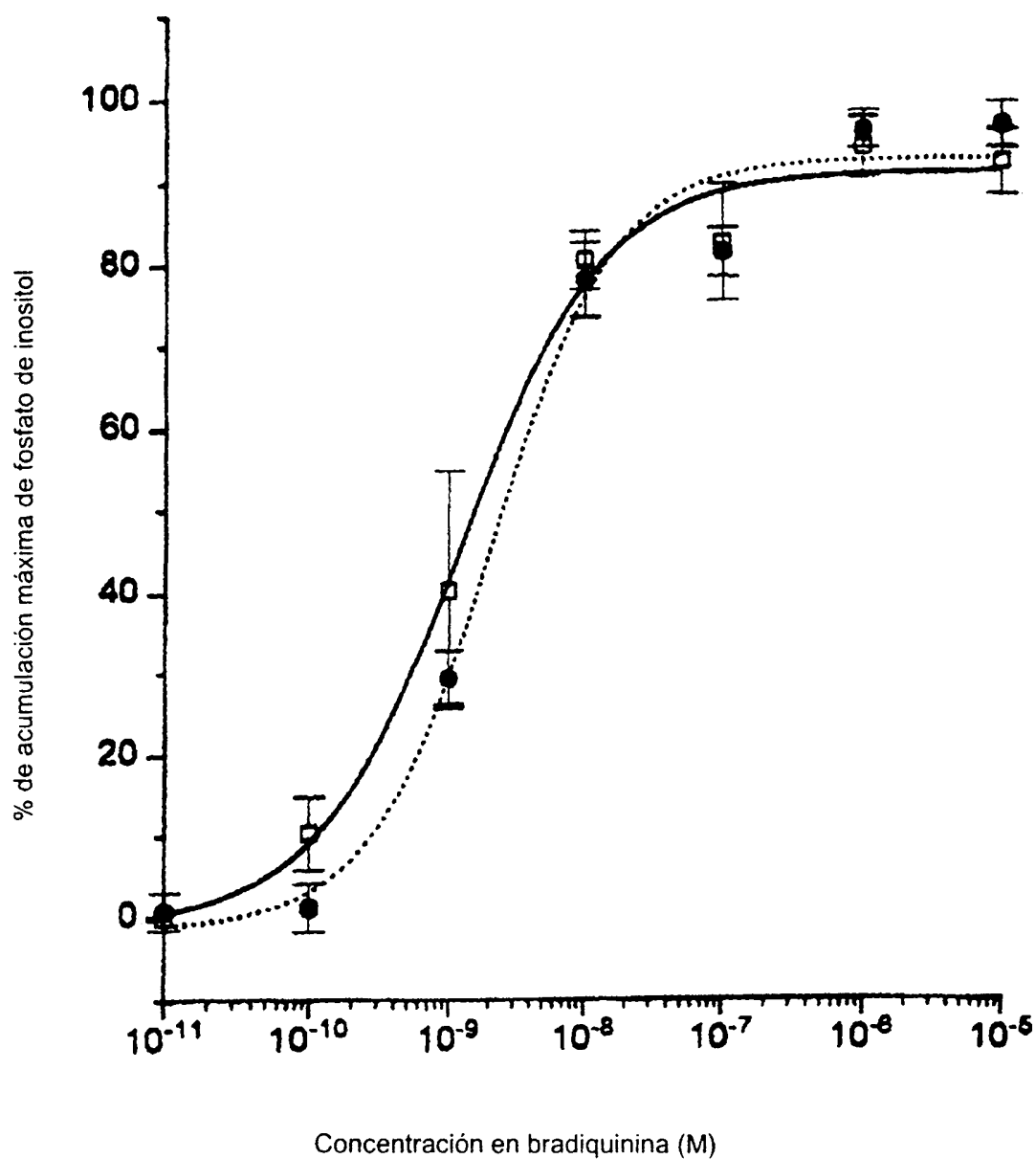


Fig 2



● CNCM I-1777 $EC_{50} = 3,26 \times 10^{-9} \text{ M}$
 □ primario $EC_{50} = 2,02 \times 10^{-9} \text{ M}$

Fig 3

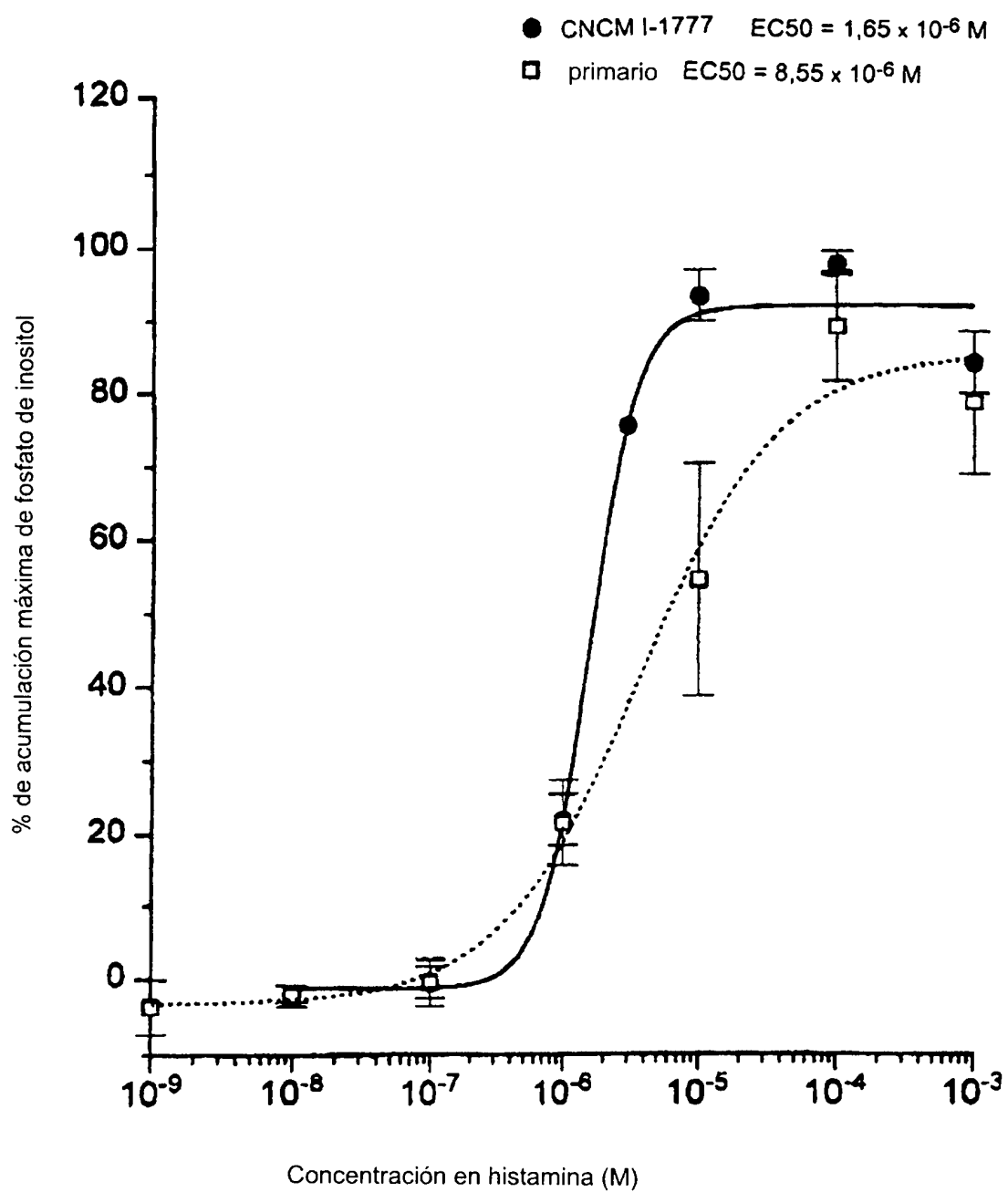


Fig 4

