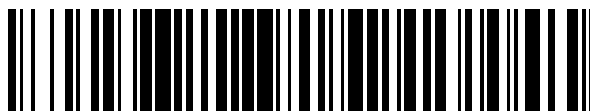


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 283**

51 Int. Cl.:
C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04760621 .5**
- 96 Fecha de presentación: **29.04.2004**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1653807**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.05.2006**

54 Título: **Uso de microorganismos dérmicos**

30 Prioridad:
01.05.2003 US 466793 P
06.08.2003 US 492754 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2012

73 Titular/es:
MEDGENICS, INC.
3400 WEST BAYSHORE ROAD
PALO ALTO, CA 94303, US

72 Inventor/es:
BELLOMO, Stephen, F.;
LIPPIN, Itzhak;
PIVA, Guillermo, Alberto;
ROSENBERG, Lior;
BUKHMANN, Mordechai;
STERN, Baruch, S.;
SHALHEVET, David;
SHAVITT, Menachem, D.;
PEARLMAN, Andrew, L.;
NOAM, Shani y
ALMON, Einat

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 386 283 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

Uso de microorganismos dérmicos.

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención se refiere al campo de los microorganismos a base de tejidos y microorganismos terapéuticos a
5 base de tejidos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Se conocen diversos procedimientos para la administración de agentes terapéuticos. Por ejemplo, los
agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral, transdérmica, por inhalación, por inyección y mediante un
depósito de liberación retardada. En cada uno de estos casos, el procedimiento de administración está limitado por
10 los procesos corporales a los que queda sometido el agente, por el requerimiento de una administración frecuente y
por las limitaciones del tamaño de las moléculas que pueden utilizarse. En algunos de estos procedimientos, la
cantidad del agente terapéutico varía entre administraciones.

[0003] Un microorganismo dérmico (DMO), que puede mantenerse fuera del cuerpo (“*ex vivo*” o “*in vitro*”) en un
estado funcional autónomo durante un periodo prolongado de tiempo y que puede someterse a diversas
15 manipulaciones, puede implantarse después subcutáneamente o en el interior del cuerpo con el fin de tratar
enfermedades o trastornos o con fines de cirugía plástica. El DMO puede modificarse para expresar un producto
génico de interés. Estos microorganismos dérmicos modificados se denominan generalmente microorganismos terapéuticos
dérmicos (DTMO).

[0004] Se ha observado que los microorganismos de piel que incluyen capas de los tejidos dérmicos y
20 epidérmicos, por ejemplo, según se resume en el documento PCT/IL02/0880, están asociados con una serie de
problemas clínicos. La recogida de una muestra de piel deja una herida superficial en el paciente que puede durar
varias semanas y puede dejar cicatrices. La muestra de piel recogida necesita un procesamiento considerable para
generar microorganismos a partir de ella. Además, se ha observado que la implantación de microorganismos de piel de
manera subcutánea o más profundamente en el cuerpo da lugar al desarrollo de quistes o microquistes de queratina.
25 Adicionalmente, la implantación de microorganismos de piel como injertos en “cortes” en la superficie de la piel requiere
una pericia técnica considerable para manipular el MO manteniendo su orientación correcta.

[0005] La recogida de dermis, por ejemplo, para usarla como “material de relleno” en un procedimiento de
cirugía plástica o de cosmética, es conocida en la técnica. Las técnicas de recogida convencionales incluyen el uso
de un dermatomo o un escalpelo para exfoliar una capa de epidermis con el fin de exponer una sección de la dermis.
30 El dermatomo o escalpelo puede usarse entonces de nuevo para recoger manualmente la sección expuesta de la
dermis.

[0006] Otro aparato convencional para la recogida de dermis, aunque no de uso común, es el recogedor de
tejido dérmico Martin, comercializado por Padgett (artículo n° P-225), para la recogida de cilindros dérmicos de la
espalda para su posterior implantación en los labios en procedimientos cosméticos de aumento de labios. Para
35 utilizar este dispositivo, que no es de uso común, un tubo de corte afilado que incluye un tubo reutilizable de paredes
gruesas con un diámetro interior de aproximadamente 4,5 mm se gira manualmente a muy poca velocidad.
Normalmente, el uso de este tipo de dispositivo requiere ejercer presión sobre la superficie de la piel directamente
sobre el sitio de recogida y la colocación de suturas de tensión activa a medida que se empuja el tubo hacia delante.
Además, generalmente la dermis recogida resultante no tiene forma ni dimensiones uniformes e incluye “bloques” de
40 epidermis a cada extremo del cilindro dérmico.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0007] La invención según se define en las reivindicaciones adjuntas 1-12 se refiere primeramente a un
microorganismo dérmico modificado genéticamente que expresa al menos un producto génico recombinante, en que el,
al menos un producto génico recombinante es un agente terapéutico, en que dicho microorganismo dérmico es un
45 explante de tejido vivo que consta esencialmente de varios componentes dérmicos sin incluir capas epidérmicas,
que conservan la microarquitectura y la estructura tridimensional del tejido dérmico del que se derivan, con
dimensiones seleccionadas para permitir la difusión pasiva de los nutrientes y gases adecuados a las células de
dicho microorganismo dérmico y la difusión de los residuos celulares fuera de dichas células para minimizar la toxicidad
y concomitante muerte celular debida a una nutrición insuficiente y a la acumulación de residuos en dicho
50 microorganismo dérmico, en que una dimensión de longitud es de 10-60 mm, en que al menos una dimensión de
sección transversal es de 0,5-3,5 mm, en que al menos algunas de dichas células expresan al menos una porción de
al menos un producto génico recombinante; y en que dicho explante de microorganismo dérmico puede mantenerse
como explante *in vitro* durante varios meses y en que dicho microorganismo dérmico modificado genéticamente se

destina al uso en un procedimiento de tratamiento en que el microorganismo dérmico modificado genéticamente se implanta en o bajo la piel de un sujeto receptor y en que el microorganismo dérmico modificado genéticamente produce y secreta dicho al menos un producto génico recombinante.

- La invención también se refiere al uso de un microorganismo dérmico modificado genéticamente que expresa al menos un producto génico recombinante, en que el, al menos un producto génico recombinante es un agente terapéutico, en que dicho microorganismo dérmico es un explante de tejido vivo que consta esencialmente de varios componentes dérmicos sin incluir capas epidérmicas, que conservan la microarquitectura y la estructura tridimensional del tejido dérmico del que se derivan, con dimensiones seleccionadas para permitir la difusión pasiva de los nutrientes y gases adecuados a las células de dicho microorganismo dérmico y la difusión de los residuos celulares fuera de dichas células para minimizar la toxicidad y concomitante muerte celular debida a una nutrición insuficiente y a la acumulación de residuos en dicho microorganismo dérmico, en que una dimensión de longitud es de 10-60 mm, en que al menos una dimensión de sección transversal es de 0,5-3,5 mm, en que al menos algunas de dichas células expresan al menos una porción de al menos un producto génico recombinante; y en que dicho explante de microorganismo dérmico puede mantenerse como explante *in vitro* durante varios meses para la determinación *in vitro* del nivel de secreción de dicho al menos un producto génico recombinante.

[0008] En este documento se desvela un DMO/DTMO con capacidad de mantenimiento *ex vivo* en un estado generalmente viable que puede permitir la realización de diversas manipulaciones en el DMO mientras se conserva un alto nivel de producción y secreción del agente terapéutico deseado. Además, en este documento se desvela un procedimiento de recogida de un DMO y subsiguiente implantación de un DTMO sin la formación de quistes o microquistes de queratina, por ejemplo, al implantar el DTMO de manera subcutánea o más profundamente en el cuerpo. Además, los expertos en la técnica apreciarán que los procedimientos y dispositivos de acuerdo con algunas realizaciones pueden ser relativamente simples y, por lo tanto, el nivel de destreza requerido de un profesional para llevar a cabo estos procedimientos y/o usar estos dispositivos puede no ser tan exigente como el requerido en los procedimientos convencionales.

[0009] En este documento se desvela un microorganismo dérmico (DMO) con varios componentes dérmicos que puede incluir células del tejido dérmico y una matriz circundante. El DMO de acuerdo con las realizaciones de la invención puede conservar generalmente la microarquitectura y la estructura tridimensional del órgano dérmico del que se ha obtenido y las dimensiones del DMO pueden permitir la difusión pasiva de los nutrientes y gases adecuados a las células y la difusión de los residuos celulares fuera de dichas células para minimizar la toxicidad y concomitante muerte celular debida a una nutrición insuficiente y a la acumulación de residuos.

[0010] En algunas realizaciones ejemplares de la invención, el microorganismo dérmico no produce queratina o produce cantidades despreciables de queratina.

[0011] En algunas realizaciones de la invención, el microorganismo dérmico no produce queratina ni/o quistes de queratina después de una implantación subcutánea o más profunda en el cuerpo.

[0012] En otra realización de la invención, el microorganismo dérmico produce microquistes de queratina, que se atrofian en un periodo de tiempo relativamente breve, por ejemplo, días o semanas después de la implantación subcutánea.

[0013] En otra realización de la invención, el microorganismo dérmico contiene folículos pilosos y glándulas sebáceas que se atrofian después de un breve periodo de tiempo, por ejemplo, días o semanas.

[0014] En otra realización de la invención, el microorganismo dérmico contiene glándulas que conectan con la superficie de la piel después de un breve periodo de tiempo, por ejemplo, días o semanas.

[0015] En este documento se desvela además un procedimiento y un aparato para la recogida de un microorganismo dérmico. El procedimiento puede incluir la estabilización y/o el soporte de una estructura de tejido cutáneo de la que va a recogerse un microorganismo dérmico, por ejemplo, de modo que la estructura de tejido cutáneo se mantenga en una forma y/o posición deseadas, la separación de al menos una porción del microorganismo dérmico de la estructura de tejido cutáneo y el aislamiento del cuerpo del microorganismo dérmico separado. La configuración de soporte puede incluir un primer elemento tubular y la herramienta de corte puede incluir un segundo elemento tubular adaptado para su inserción a lo largo del primer elemento y de manera sustancialmente coaxial con este. La configuración de soporte puede incluir una cámara de vacío con una superficie de soporte interior capaz de mantener la estructura de tejido cutáneo en una forma y/o posición deseadas para permitir que la herramienta de corte separe el DMO de dicha estructura de tejido cutáneo.

[0016] En este documento se desvela además un microorganismo dérmico modificado genéticamente que expresa al menos un producto génico recombinante, en que el microorganismo dérmico tiene varios componentes dérmicos, incluidas las células y la matriz del tejido dérmico, que conservan la microarquitectura y la estructura

tridimensional del tejido dérmico del que se han obtenido y tiene unas dimensiones seleccionadas para permitir la difusión pasiva de los nutrientes y gases adecuados a las células y la difusión de los residuos celulares fuera de las células para minimizar la toxicidad y concomitante muerte celular debida a una nutrición insuficiente y a la acumulación de residuos, en que al menos algunas de las células del microorganismo dérmico expresan al menos un producto génico recombinante o al menos una porción de dicho al menos un producto génico recombinante.

[0017] En este documento se desvela adicionalmente un microorganismo dérmico modificado genéticamente que expresa al menos una proteína recombinante, en que el microorganismo dérmico tiene varios componentes dérmicos, incluidas las células y la matriz del tejido dérmico, que conservan la microarquitectura y la estructura tridimensional del tejido dérmico del que se han obtenido y tiene unas dimensiones seleccionadas para permitir la difusión pasiva de los nutrientes y gases adecuados a las células y la difusión de los residuos celulares fuera de las células para minimizar la toxicidad y concomitante muerte celular debida a una nutrición insuficiente y a la acumulación de residuos, en que al menos algunas de las células del microorganismo dérmico expresan al menos una porción de al menos una proteína recombinante.

[0018] En algunas realizaciones de la invención, el microorganismo dérmico modificado genéticamente sustancialmente no produce queratina.

[0019] Se desvela un procedimiento para la administración de un producto génico recombinante producido por el microorganismo dérmico a un receptor.

[0020] Se desvela un procedimiento para inducir un efecto fisiológico local o sistémico mediante la implantación de un microorganismo dérmico en un receptor.

[0021] En este documento se desvela también un procedimiento para la administración de una proteína de interés a un sujeto. El procedimiento incluye la implantación del microorganismo dérmico modificado genéticamente en la piel, bajo la piel o en otros lugares del cuerpo.

[0022] Además, en este documento se desvela un procedimiento para la implantación de un microorganismo dérmico para evitar o reducir la formación de quistes de queratina.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023] Algunas realizaciones no limitantes se describen en la descripción siguiente, que ha de leerse con referencia a las figuras anejas a este documento. En las figuras, las estructuras, elementos o partes de estos idénticos y similares que aparecen en más de una figura están marcados generalmente con referencias idénticas o similares en las figuras en las que aparecen. Las dimensiones de los componentes y las características mostradas en las figuras se han seleccionado fundamentalmente por razones de conveniencia y claridad de la presentación y no están necesariamente a escala.

[0024] La figura 1 es un diagrama de bloques esquemático de un procedimiento ejemplar para la producción y utilización de microorganismos terapéuticos dérmicos (DMO).

[0025] Las figuras 2A y 2B muestran, respectivamente, un análisis de correlación entre la secreción *in vitro* por mIFN α -TMO y hEPO-TMO antes de la implantación y los niveles en el suero *in vivo* después de su implantación.

[0026] Las figuras 3A y 3B muestran, respectivamente, el aumento de los niveles de hEPO en el suero determinados por un ensayo ELISA y el aumento del recuento de reticulocitos después de la implantación autóloga de un TMO en un cerdo enano.

[0027] La figura 4 es una ilustración esquemática de una gráfica que muestra los niveles de secreción de eritropoyetina humana (hEPO) por DTMO-hEPO preparados a partir de seis pieles humanas diferentes.

[0028] La figura 5 muestra la histología de un DTMO y un TMO de piel de espesor parcial.

[0029] La figura 6 muestra la tinción inmunohistoquímica (IHC) y con hematoxilina y eosina (H&E) de un DTMO.

[0030] La figura 7 muestra los niveles *in vivo* de hEPO en el suero y el efecto fisiológico sobre los niveles de hematocrito después de la implantación subcutánea de DTMO-hEPO y TMO-hEPO de piel de espesor parcial en ratones SCID.

[0031] La figura 8 muestra el análisis clínico e histológico de DTMO-hEPO y TMO-hEPO de piel de espesor parcial implantados subcutáneamente en ratones SCID.

- [0032] La figura 9 muestra el análisis histológico de MO de piel injertados en cortes de la piel (MO de piel de espesor parcial, derecha) o implantados subcutáneamente (DMO, izquierda) a los 17 días después de la implantación en voluntarios sanos.
- [0033] La figura 10 es un diagrama de flujo esquemático que ilustra un procedimiento de recogida de un DMO.
- 5 [0034] Las figuras 11a-11c son ilustraciones esquemáticas de etapas ejemplares de la recogida de un DMO de acuerdo con el procedimiento de la figura 10.
- [0035] La figura 12 es una ilustración esquemática de una herramienta de pinzamiento que puede usarse en un aparato de recogida de tejido dérmico.
- [0036] La figura 13 es una ilustración esquemática de un aparato de recogida de tejido dérmico que incluye un tubo cortador de cilindros insertado en una fuente de tejido para un DMO y que recoge coaxialmente con una aguja guía interior.
- 10 [0037] Las figuras 14a-14c son ilustraciones esquemáticas de una vista frontal, una vista lateral y una vista desde arriba, respectivamente, de un aparato de recogida de tejido dérmico de vacío.
- [0038] La figura 15 es una ilustración esquemática de una vista de sección transversal del aparato de las figuras 14a-14c que soporta un microorganismo dérmico en una posición deseada.
- [0039] La figura 16 es una ilustración esquemática de una vista de sección transversal del aparato de la figura 15 que soporta externamente un microorganismo dérmico que va a recogerse en una posición deseada.
- [0040] La figura 17 es una ilustración esquemática de un aparato de recogida de tejido dérmico.
- [0041] La figura 18 es una ilustración esquemática de un aparato de recogida.
- 20 [0042] La figura 19 es una ilustración esquemática de la implementación del aparato de recogida de la figura 18 para la recogida de un DMO.
- [0043] La figura 20 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento de implantación de un DTMO.
- [0044] La figura 21 es un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento de ablación de un DTMO.
- [0045] La figura 22 es una ilustración esquemática de un sistema para el procesamiento de un DMO recogido.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES EJEMPLARES

- [0046] La descripción siguiente se presenta para capacitar a un experto en la técnica para realizar y usar la invención según se proporciona en el contexto de una aplicación particular y de sus requerimientos. En otros casos, los métodos, procedimientos y componentes bien conocidos no se han descrito en detalle para no complicar la presente invención.
- 30 [0047] En la descripción detallada siguiente se exponen numerosos detalles específicos con el fin de proporcionar una profunda comprensión de la presente invención. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que la presente invención puede ponerse en práctica sin estos detalles específicos.

DEFINICIONES EJEMPLARES DE LOS TÉRMINOS USADOS EN ESTE DOCUMENTO

- [0048] El término “explante”, según se usa en este documento, se refiere en algunas realizaciones de la invención a una sección de un tejido u órgano vivo extraída de uno o más tejidos u órganos de un sujeto.
- 35 [0049] El término “microorganismo dérmico” o “DMO”, según se usa en este documento, se refiere en algunas realizaciones de la invención a una estructura aislada de un tejido u órgano derivada de, o idéntica a un explante que ha sido preparada para conservar la viabilidad y funcionalidad celular, a la vez que se mantienen al menos algunas de las interacciones *in vivo* similares a las de los tejidos o el órgano del que se ha obtenido. Los microorganismos dérmicos pueden incluir varios componentes dérmicos que conservan la microarquitectura del tejido o el órgano del que se derivan y la estructura tridimensional del tejido dérmico del que se derivan, con dimensiones seleccionadas para permitir la difusión pasiva de los nutrientes y gases adecuados a las células dentro del MO y la difusión de los residuos celulares fuera de las células del MO para minimizar la toxicidad y concomitante muerte celular debida a una nutrición insuficiente y a la acumulación de residuos. Los microorganismos dérmicos pueden
- 40 microorganismos dérmicos pueden incluir varios componentes dérmicos que conservan la microarquitectura del tejido o el órgano del que se derivan y la estructura tridimensional del tejido dérmico del que se derivan, con dimensiones seleccionadas para permitir la difusión pasiva de los nutrientes y gases adecuados a las células dentro del MO y la difusión de los residuos celulares fuera de las células del MO para minimizar la toxicidad y concomitante muerte celular debida a una nutrición insuficiente y a la acumulación de residuos. Los microorganismos dérmicos pueden
- 45 constar esencialmente de varios componentes de la dermis (componentes tisulares de la piel localizados debajo de la epidermis). Estos componentes pueden contener fibroblastos de la piel, células epiteliales, otros tipos de células, bases de folículos pilosos, terminaciones nerviosas, glándulas sudoríparas y sebáceas y vasos sanguíneos y

linfáticos. Cuando se usa más adelante en este documento, la descripción de las realizaciones que se refieren a un MO se refiere también a un MO dérmico. Cuando se usa el término “tejido dérmico”, se refiere también a “órgano dérmico”.

5 **[0050]** Según se usa en este documento, el término “microarquitectura” se refiere a la característica del explante por la que las células de la población mantienen *in vitro* su contacto físico y/o funcional con al menos una sustancia celular o no celular con la que estaban en contacto físico y/o funcional *in vivo*. Preferentemente, las células del explante mantienen al menos una actividad biológica del órgano o el tejido del que se han aislado.

10 **[0051]** El término “donante”, según se usa en este documento, se refiere en algunas realizaciones de la invención a un sujeto del que se extrae el explante que se usa para formar uno o más microórganos o está ya en forma de estos.

15 **[0052]** El término “microórgano terapéutico (TMO)”, según se usa en este documento, se refiere en algunas realizaciones de la invención a un microórgano (MO) que puede usarse para facilitar un objetivo terapéutico como, por ejemplo, un MO que ha sido alterado o modificado genéticamente para producir un agente terapéutico, como una proteína o una molécula de ARN. El agente terapéutico puede ser o no una sustancia presente en el cuerpo de un TMO se refiere también a un DTMO, que es un MO dérmico terapéutico modificado genéticamente.

20 **[0053]** El término “implantación”, según se usa en este documento, se refiere en algunas realizaciones a la introducción de uno o más TMO o DTMO en un receptor, en que dichos TMO o DTMO pueden derivarse de tejidos del receptor o de tejidos de otro individuo o animal. Los TMO o DTMO pueden implantarse en un corte en la piel, implantarse subcutáneamente o colocarse en otros lugares deseados dentro del cuerpo del receptor.

[0054] El término “receptor”, según se usa en este documento, se refiere en algunas realizaciones de la invención a un sujeto en el que se implantan uno o más TMO o DTMO.

[0055] El término “pinzamiento” (por ejemplo, de la piel), según se usa en este documento, puede referirse a cualquier acción similar o a cualquier acción con una finalidad similar, por ejemplo, “pellizco” (por ejemplo, de la piel).

25 **[0056]** El término “*in vitro*”, según se usa en este documento, debe entenderse que incluye “*ex vivo*”.

[0057] El término “tubo cortador de cilindros”, según se usa en este documento, puede referirse individual o colectivamente a los términos “herramienta de corte”, “tubo de corte” y “aguja cortadora de cilindros”, así como a cualquier otro elemento con funcionalidad similar.

30 **[0058]** Mientras que, por razones de claridad y completitud de la presentación, en este documento se describen todos los aspectos de la producción y la utilización de los DTMO y las realizaciones se describen desde el principio hasta el final del proceso, debe entenderse que cada uno de los aspectos descritos en este documento puede usarse con otras metodologías y/o equipamiento para llevar a cabo otros aspectos y puede usarse para otros fines, algunos de los cuales se describen en este documento. La presente descripción incluye partes dedicadas a la preparación y el mantenimiento de microórganos dérmicos para su transformación en DTMO. Debe entenderse que los microórganos dérmicos producidos de acuerdo con estos aspectos pueden usarse para otros fines distintos de la transformación en DTMO.

35 **[0059]** El microórgano es un microórgano dérmico que incluye varios componentes de la dermis, por ejemplo, fibroblastos y/o componentes epiteliales que contienen terminaciones nerviosas y/o glándulas sudoríparas y/o glándulas sebáceas y/o vasos sanguíneos y linfáticos y/o fibras de elastina y/o fibras de colágeno y/o componentes endoteliales y/o células derivadas del sistema inmunitario y/o matriz extracelular. Como demuestran los resultados de los ensayos que se resumen en la sección de ejemplos más adelante (ejemplo 5, figura 8), la implantación subcutánea convencional de un microórgano que incluye capas epidérmicas (“MO de piel de espesor parcial”) en ratones y cerdos (no se muestran los datos de los cerdos) puede dar lugar a la formación de quistes de queratina o macroquistes de queratina. En contraste, cuando se toman muestras de tejido cutáneo para obtener un DMO no se observan quistes ni macroquistes en ratones, cerdos ni humanos. Debe señalarse que la actividad biológica (por ejemplo, la secreción de una proteína terapéutica, por ejemplo, eritropoyetina y, como resultado, el aumento del hematocrito) de un DTMO puede ser comparable o incluso mayor que la de un TMO derivado de piel de espesor parcial (véase el ejemplo 4). Es decir, ambos tipos de preparación pueden liberar la misma cantidad de eritropoyetina; sin embargo, el DTMO puede producir y secretar mayores cantidades de proteína por unidad que un TMO derivado de piel de espesor parcial.

50 **[0060]** En general, la producción de un DTMO puede incluir la recogida de un DMO, el mantenimiento del DMO y/o la modificación del DMO y/o su alteración genética y, en algunas realizaciones, la verificación de la producción de un agente deseado (por ejemplo, proteínas) por el DMO. La utilización de un DTMO puede incluir la

producción de sustancias terapéuticas, como proteínas, dentro del propio cuerpo de un paciente o un animal para el tratamiento del sujeto. Por ejemplo, el DTMO puede implantarse en o bajo la piel o dentro del cuerpo del sujeto para producir el agente o la proteína *in vivo*. En el caso de que el tejido sea otro sujeto, el implante se protege opcionalmente de la reacción del sistema inmunitario del receptor, por ejemplo, alojando el DTMO en una cápsula o cubierta inmunoprotectora. Por ejemplo, puede colocarse una membrana que rodee al DTMO colocando dicho DTMO en una cápsula antes de la implantación o al contrario. La membrana debe tener un tamaño de poro suficientemente grande para permitir el paso de nutrientes, residuos y del agente terapéutico, pero suficientemente pequeño para evitar el paso de las células del sistema inmunitario.

[0061] El DMO no incluye capas epidérmicas.

- 10 **[0062]** En una realización de la invención, el DMO incluye toda la sección transversal de la dermis. En otra realización de la invención, el microorganismo dérmico incluye parte de la sección transversal de la dermis. En otra realización, el DMO incluye la mayor parte de la sección transversal de la dermis, es decir, la mayor parte de las capas y componentes de la dermis, incluidas la dermis papilar y reticular. En otra realización, el DMO incluye principalmente tejido dérmico, pero también puede incluir tejido adiposo. En algunas realizaciones de la invención, el DMO no produce queratina o produce una cantidad despreciable de queratina, con lo que se evita la producción de quistes de queratina después de la implantación subcutánea en un paciente.

- 20 **[0063]** El DMO que va a recogerse puede extraerse del cuerpo por cualquier procedimiento de extracción de tejidos conocido en la técnica, como los procedimientos de biopsia. El procedimiento de recogida deja intacta la microarquitectura del tejido del que se extrae. En una realización, el DMO puede obtenerse por biopsia directa y luego cortarse al tamaño requerido o escindir de este el tejido no deseado. En otra realización, puede obtenerse una muestra de tejido por biopsia directa, en la que se obtiene el tamaño deseado del microorganismo y no se requiere ningún procesamiento adicional.

- 25 **[0064]** En algunas realizaciones desveladas en este documento, el microorganismo dérmico se recoge directamente del cuerpo y la herramienta de corte usada para la recogida del microorganismo dérmico puede tener, por ejemplo, aproximadamente 1-4 mm de diámetro. En otra realización puede tener, por ejemplo, 1,71 mm de diámetro. En otra realización puede tener, por ejemplo, 1-3 mm de diámetro. En otra realización puede tener, por ejemplo, 2-4 mm de diámetro. En otra realización puede tener, por ejemplo, 1-2 mm de diámetro. En otra realización puede tener, por ejemplo, aproximadamente 1,5 mm de diámetro. En otra realización puede tener, por ejemplo, aproximadamente 2 mm de diámetro. En algunas realizaciones, el microorganismo dérmico recogido puede no conservar su forma cilíndrica después de la recogida, es decir, al menos una dimensión de su sección transversal puede expandirse mientras que al menos otra dimensión de su sección transversal puede contraerse. En una realización, por ejemplo, al menos una dimensión puede ser de 0,5-3,5 mm y al menos una dimensión puede ser de 1,5-10 mm.

- 35 **[0065]** En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 5-100 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 10-60 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 20-60 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 20-50 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 20-40 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 20-100 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 30-100 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 40-100 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 50-100 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 60-100 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 70-100 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 80-100 mm de longitud. En otra realización, el tejido que se recoge puede tener, por ejemplo, aproximadamente 90-100 mm de longitud, un aparato biorreactor cerrado y estéril puede usarse para transportar, soportar y/o alterar el DMO o DTMO durante la recogida, mm en longitud. En otra realización, la longitud puede ser de aproximadamente 20 mm. En otra realización, la longitud puede ser de aproximadamente 30 mm. En otra realización, la longitud puede ser de aproximadamente 40 mm.

- 50 **[0066]** Cuando un MO dérmico tiene las dimensiones listadas anteriormente puede mantenerse *in vitro*, por ejemplo, en un medio de cultivo con las condiciones de cultivo de tejidos adecuadas por periodos de tiempo prolongados, por ejemplo, varios días, varias semanas o varios meses. El DMO puede mantenerse *in vitro*, por ejemplo, en medios de cultivo definidos. En una realización ejemplar, los medios de cultivo pueden incluir factores de crecimiento, suero bovino fetal (FCS) o suero humano, por ejemplo, sustituto de suero sintético (SSS). En otra realización ejemplar, los medios de cultivo pueden incluir suero del sujeto donante o del receptor. En otra realización más, los medios de cultivo pueden incluir suero autólogo.

[0067] En este documento se desvela un aparato biorreactor estéril y cerrado que puede usarse para transportar, soportar y/o alterar el DMO o DTMO durante el proceso de recogida, alteración e implantación, por ejemplo, desde la recogida hasta la implantación, según se describe en detalle más adelante, por ejemplo, con referencia a la figura 22. De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares, al menos parte del aparato biorreactor
5 puede estar compuesto de material desechable.

[0068] El aparato biorreactor que se desvela en este documento puede cargarse en una estación de acoplamiento, que puede usarse para llevar a cabo diversos procesos y/o para mantener el DMO o DTMO en las condiciones deseadas. Opcionalmente, el aparato puede controlarse por ordenador de acuerdo con un protocolo.

[0069] De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones desveladas en este documento, en una determinada sesión de tratamiento puede usarse solo una porción del DTMO generado. El resto del tejido del DTMO
10 puede retornarse para su mantenimiento y/o puede almacenarse (por ejemplo, criogénicamente o de otro modo) para un uso posterior.

[0070] Una característica de algunas realizaciones desveladas en este documento es que es posible procesar conjuntamente un elevado número de microorganismos en un proceso por lotes para obtener los DTMO, según se describe más adelante. Esto puede permitir un procesamiento más conveniente, pero no permite determinar por separado el nivel de secreción de cada DTMO.
15

[0071] En algunas realizaciones ejemplares de la invención, puede llevarse a cabo un ensayo de potencia para el agente terapéutico, que puede ser producido y/o secretado por un único DTMO o por un lote de DTMO. El ensayo de potencia puede incluir, por ejemplo, un ensayo de proliferación celular en el que la respuesta de proliferación de las células depende principalmente de la presencia del agente terapéutico en el medio de cultivo de las células.
20

[0072] El término “estructura de tejido cutáneo”, según se usa en este documento, se refiere a una estructura de componentes tisulares que puede ser estabilizada y/o soportada por los aparatos definidos en este documento para permitir la recogida de un microorganismo dérmico a partir de esta. Una estructura de tejido cutáneo puede incluir componentes del tejido epidérmico y componentes del tejido dérmico. Opcionalmente, la estructura de tejido cutáneo puede incluir tejido adiposo y/o tejido muscular en la proximidad del tejido dérmico.
25

[0073] En este documento se desvela un procedimiento de recogida del microorganismo dérmico que puede incluir la estabilización y el soporte de una estructura de tejido cutáneo, a partir de la cual va a recogerse el microorganismo, por ejemplo, de modo que al menos el microorganismo dérmico y/o uno o más segmentos tisulares adicionales próximos se mantengan en una forma y/o posición deseadas, la separación de al menos una porción del microorganismo dérmico del tejido circundante y la extracción del microorganismo dérmico separado, según se describe en detalle más adelante.
30

[0074] La figura 1 muestra una visión general en forma de diagrama de bloques de una metodología 200 para la producción y la utilización de los DMO y DTMO. En el bloque 202 se recoge un DMO de un sujeto. En algunas realizaciones, el DMO se recoge del mismo sujeto al que después se administrará el tratamiento. En la invención, el DMO es de tejido dérmico. Mientras que el procedimiento que se describe más adelante es ejemplar, es posible usar otros procedimientos para la recogida de muestras de tejido. Si se desea, el DMO puede almacenarse criogénicamente para un uso posterior (es decir, su introducción en la misma etapa del proceso). Alternativamente, en algunas realizaciones el DMO puede reimplantarse directamente en el paciente del que se recogió para producir un efecto terapéutico, cosmético u otro efecto fisiológico.
35
40

[0075] Para que un DMO sea un microorganismo viable, debe tener al menos una dimensión suficientemente pequeña para que los nutrientes puedan difundirse a todas las células del DMO desde un medio nutritivo que está en contacto con el DMO y para que los productos de desecho puedan difundirse fuera del DMO al medio. Esto permite al DMO ser viable *in vitro* durante el tiempo suficiente para el procesamiento posterior descrito más adelante y para la utilización opcional del DMO como fuente de un agente terapéutico, como una proteína. Generalmente, el procedimiento de recogida de un DMO según se describe anteriormente resulta en un DMO con una vida útil *in vitro* de varios meses.
45

[0076] Después de haber recogido el DMO, este se inspecciona opcionalmente de manera visual para determinar si está formado adecuadamente y tiene las dimensiones deseadas. La inspección también puede realizarse ópticamente. El DMO se monta entonces opcionalmente en un soporte y se transporta (bloque 206) a un aparato (el biorreactor, según se describe más adelante) en el que puede alterarse genéticamente. Se prepara un agente de modificación genética adecuado (bloque 208). Algunos procedimientos ejemplares alternativos de preparación del agente incluyen la creación de alícuotas con una cantidad deseada, mediante el uso de un tampón de dilución definido previamente, de un agente modificante como, por ejemplo, un vector vírico, el posible almacenamiento criogénico y la descongelación del agente modificante a temperatura controlada (0-4°C) y la
50
55

validación de la actividad del agente modificante. Todos estos procesos son bien conocidos en la técnica. En este momento, el DMO puede almacenarse criogénicamente para su introducción posterior en el mismo punto del proceso. Esto puede realizarse mediante protocolos conocidos para la congelación gradual de tejidos y células, por ejemplo, con el uso del medio DMEM con DMSO al 10%.

- 5 **[0077]** En el bloque 210 se altera genéticamente el DMO. Según se describe anteriormente, se conocen numerosos procedimientos de alteración genética que pueden usarse en combinación con la presente invención. A modo de ejemplo, la siguiente descripción se basa en el uso de un vector vírico para la inserción de un gen en las células del DMO. Este procedimiento es bien conocido y no se describirá en detalle, con excepción de la metodología y aparatos especiales para la introducción del virus en el DMO.
- 10 **[0078]** En el bloque 212, el DTMO alterado genéticamente se somete opcionalmente a ensayos para determinar las tasas de producción y secreción del agente terapéutico. Existen diversos procedimientos para determinar la cantidad de secreción, por ejemplo, ELISA, otros inmunoensayos, análisis espectral, etc. Además, se analiza opcionalmente la calidad de la secreción, por ejemplo, en cuanto a esterilidad y actividad de la proteína secretada. Esto puede realizarse periódicamente o de manera continua en línea. El DTMO puede almacenarse
- 15 criogénicamente en este momento para su uso posterior.

[0079] En los bloques 214 y 216 se determina la cantidad de DTMO requerida para la producción de un efecto terapéutico deseado. Según se indica más adelante, los requerimientos de dosis terapéutica pueden estimarse a partir de las tasas de secreción medidas, los parámetros del paciente y estadística poblacional aplicada a la relación estimada o conocida entre la secreción *in vitro* y los niveles en el suero *in vivo*.

- 20 **[0080]** En el bloque 218 se carga el número seleccionado de DTMO en las herramientas de implantación. Algunas herramientas de implantación ejemplares se han descrito anteriormente. Si se necesita, para aloinjertos o xenoinjertos o por otros motivos, el DTMO puede encapsularse. Si el DTMO debe transportarse antes de su transporte a las herramientas de implantación, se coloca opcionalmente en una estación de mantenimiento (220), en la que se mantienen la temperatura, humedad, etc., a niveles que permiten al DTMO conservar la viabilidad durante
- 25 el transporte. El material de DTMO restante se mantiene opcionalmente *in vitro* para su uso posterior. Esto puede realizarse en las condiciones de un incubador caliente (30-37°C), en las condiciones descritas anteriormente o en las condiciones de un incubador frío (4°C), que pueden prolongar su viabilidad *in vitro*.

- [0081]** En el bloque 224 se implanta un subgrupo de los DTMO en el sujeto. Una realización ejemplar de un procedimiento de implantación se describe anteriormente. A los expertos en la técnica se les ocurrirán otros
- 30 procedimientos de implantación, que dependen principalmente de la geometría específica del microórgano que se use. Los estudios en animales han demostrado que los DMO y DTMO conservan la viabilidad *in vivo*, en el sentido de que el DTMO continúa produciendo y secretando el agente terapéutico durante un periodo de semanas o meses después de la implantación (figura 7). En los estudios en animales se producen cantidades terapéuticas durante periodos de hasta 160 días (o más). Mientras que el tejido del DMO o DTMO parece integrarse o absorberse bien en
- 35 el sujeto en el que se implanta (especialmente si el tejido se implanta en un tejido del mismo tipo que aquel del que se recogió), las células que incluyen el DMO o el DTMO continúan produciendo y secretando el agente terapéutico.

- [0082]** En ambos casos se determina opcionalmente el rendimiento del DTMO *in vivo* (bloque 228). A partir de esta evaluación, por ejemplo, y/o de datos pasados del paciente (bloque 226), puede ajustarse entonces la dosis para el paciente (bloque 230) mediante el aumento de la cantidad del implante o la extracción de parte del implante,
- 40 según se describe más adelante. A medida que cambia la eficacia del implante pueden implantarse DTMO adicionales.

- [0083]** Generalmente, la alteración genética puede incluir la incorporación en las células por manipulación genética de un gen o genes seleccionados que hacen que las células produzcan y opcionalmente secreten un agente terapéutico deseado, como una proteína. En una realización de la invención, al menos parte del proceso de
- 45 sostenimiento del DMO durante la alteración genética, así como la alteración genética en sí misma, pueden llevarse a cabo en un biorreactor, según se describe más adelante.

- [0084]** A continuación se hace referencia a la figura 10, que ilustra esquemáticamente un diagrama de flujo de un procedimiento de recogida de un microórgano dérmico de acuerdo con algunas realizaciones ejemplares de la invención y a las figuras 11a-11c que ilustran sistemáticamente etapas ejemplares de la recogida de un microórgano
- 50 dérmico 1160 situado bajo una porción de tejido cutáneo 1120 de acuerdo con el procedimiento de la figura 10.

[0085] Según se indica en el bloque 1002, el procedimiento puede incluir opcionalmente la administración local de un anestésico, por ejemplo, según se conoce en la técnica, en la proximidad del DMO que va a recogerse.

[0086] Según se indica en el bloque 1004, el procedimiento puede incluir además la inserción de una guía interior 1110 en la porción del tejido 1120. Es posible hacer finas incisiones ("cortes de lanceta") 1190 y 1130 en la

piel exterior, preferentemente mediante una lanceta quirúrgica, un escalpelo o cualquier otra sonda afilada, para permitir una fácil inserción de la guía interior 1110 y también para evitar o minimizar la recogida de tejido epidérmico. La guía interior 1110 puede insertarse en la porción 1120 a través de la incisión 1190, por ejemplo, generalmente paralela a la superficie de la piel y/o a una profundidad deseada dentro de la dermis o justo debajo de la piel. La guía interior 1110 puede incluir una aguja fina, una varilla o cualquier otro objeto fino, generalmente derecho, que pueda colocarse dentro de la dermis o en un espacio subcutáneo. Por ejemplo, la guía interior 1110 puede incluir una aguja de un tamaño de 20-25G, por ejemplo, aproximadamente de 22G, según se conoce en la técnica. La guía interior 1110 puede insertarse en la dermis o en el espacio subcutáneo y/o empujarse generalmente en sentido horizontal, es decir, en paralelo con la superficie de la piel. La longitud de penetración de la guía 1110 en la dermis puede corresponder generalmente a la longitud del DMO que va a recogerse. Por ejemplo, la guía interior 1110 puede insertarse manualmente y guiarse manualmente dentro de la dermis a una profundidad deseada, en que esta profundidad puede mantenerse sustancialmente uniforme durante todo el proceso de inserción. Alternativamente, la guía interior 1110 puede insertarse en el espacio subcutáneo y a lo largo de este mediante detección manual del límite entre la dermis fibrosa y una capa adiposa suave subyacente a medida que se inserta la guía interior.

15 **[0087]** Según se indica en el bloque 1006, el procedimiento puede incluir opcionalmente guiar la guía interior 1110 para salir de la piel, por ejemplo, por la incisión 1130. De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares, la distancia entre las incisiones 1190 y 1130 puede ser aproximadamente igual o mayor que la longitud requerida para el DMO que va a recogerse.

20 **[0088]** Según se indica en el bloque 1008, el procedimiento puede incluir también la inserción de una herramienta de corte tubular coaxialmente con la guía interior 1110 y alrededor de esta, de modo que el DMO puede quedar atrapado, es decir colocado entre la guía interior 1110 y la herramienta de corte. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante el uso de una herramienta de corte tubular con un diámetro interno mayor que el diámetro externo de la guía interior 1110. La herramienta de corte puede incluir cualquier herramienta de corte adecuada, por ejemplo, un tubo cortador de cilindros 1150. El tubo cortador de cilindros 1150 puede incluir una herramienta tubular, en general afilada simétricamente, por ejemplo, un tubo hipodérmico procesado para tener un borde de corte afilado con una forma deseada. El tubo cortador de cilindros 1150 puede incluir, por ejemplo, un tubo de calidad médica estándar con una pared delgada, por ejemplo, con un espesor de entre 0,05 mm y 0,3 mm. El tubo cortador de cilindros 1150 puede tener un diámetro, por ejemplo, de entre 1 mm y 10 mm. Las dimensiones, por ejemplo, el diámetro del tubo cortador de cilindros 1150 y/o las dimensiones de la guía interior 1110 pueden predeterminarse a partir del volumen y/o las dimensiones del DMO que se pretende recoger. El tubo cortador de cilindros 1150 puede tener un extremo afilado ("punta") 1140 adaptado para servir como borde de corte. El tubo cortador de cilindros 1150 puede insertarse a través de la porción de tejido 1120, preferentemente después de haber creado unas incisiones iniciales, por ejemplo, la incisión 1130, en la superficie exterior de la piel con el fin de evitar la recogida de tejido epidérmico.

35 **[0089]** Según se ilustra en la figura 11b, el procedimiento puede incluir la colocación inicial del extremo 1140 del tubo cortador de cilindros 1150 sobre un extremo distal de la guía interior 1110, por ejemplo, en la incisión 1130 y el deslizamiento del tubo cortador de cilindros 1150 a lo largo de la longitud de la guía interior 1110, por ejemplo, hacia la incisión 1190, para recoger el DMO dérmico.

40 **[0090]** Según se indica en el bloque 1010, el procedimiento puede incluir la rotación de la herramienta de corte mientras dicha herramienta de corte avanza, por ejemplo, hacia el extremo proximal de la guía interior. Por ejemplo, puede usarse un taladro médico u otra herramienta adecuada con un mecanismo de rotación para girar el tubo cortador de cilindros 1150 mientras se hace avanzar manual o automáticamente, con lo que se recoge el DMO 1160 más suavemente. Por ejemplo, un extremo proximal 1180 del tubo cortador de cilindros 1150 puede conectarse a un taladro médico 1170 como, por ejemplo, el taladro Aesculap Micro Speed fabricado por Aesculap AG & Co. KG, Am Aesculap Platz, D-78532 Tuttlingen, Alemania, que puede incluir una unidad de control, un motor, un cable de conexión, una pieza de mano y/o un interruptor de pie, con los números de catálogo GD650, GD658, GB661, GB166 y GB660, respectivamente. Es posible usar un taladro semejante o cualquier otro taladro o mecanismo de rotación adecuado para girar la herramienta de corte a una velocidad de rotación apropiada para el corte del tejido dérmico, por ejemplo, a una velocidad de rotación relativamente alta, por ejemplo, a una velocidad superior a 1.000 rpm, por ejemplo, de entre 1.000 rpm y 10.000 rpm. Por ejemplo, el tubo 1150 puede hacerse girar a una velocidad de rotación superior a 2.000 rpm, por ejemplo, de aproximadamente 7.000 rpm. Alternativamente, puede usarse una velocidad de rotación relativamente baja, inferior a 1.000 rpm o ninguna rotación, según se describe más adelante. Opcionalmente, la velocidad de rotación del taladro puede variar de manera oscilante, es decir, la dirección de rotación puede variar periódicamente entre la dirección de las agujas del reloj y la dirección contraria a las agujas del reloj. Mientras se gira por el taladro 1170, el tubo cortador de cilindros 1150 puede hacerse avanzar manual o automáticamente, por ejemplo, hacia el extremo proximal de la guía interior 1110, por ejemplo, hacia la incisión 1190. El procedimiento puede incluir también la parada del movimiento de avance del tubo cortador de cilindros 1150, por ejemplo, cuando la punta 1140 ha sobrepasado en su avance justamente la incisión 1190. Al menos parte de la superficie interior y/o de la superficie exterior del tubo cortador de cilindros 1150 puede estar

recubierta con un material de baja fricción, por ejemplo, teflón, parileno o cualquier otro material de recubrimiento adecuado, por ejemplo, para facilitar la separación del tejido recogido de la superficie interior de la herramienta de corte en una acción posterior y/o para reducir las fuerzas que actúan sobre el tejido durante la acción de corte, según se describe más adelante.

5 **[0091]** Un mecanismo de inserción de acción rápida, por ejemplo, accionado por un resorte, puede usarse para facilitar la penetración del tubo cortador de cilindros 1150 en el sitio seleccionado para la recogida y el corte de la dermis, por ejemplo, sin un movimiento de rotación sustancial del tubo cortador de cilindros.

[0092] Según se indica en el bloque 1012, el procedimiento puede incluir la retirada de la guía interior 1110, por ejemplo, con el DMO 1160 ensartado en esta, del interior del tubo cortador de cilindros 1150, con lo que se
10 extrae el DMO 1160 de la porción 1120.

[0093] El DMO 1160 puede dejarse insertado en la guía interior 1110. En tal caso, la guía interior 1110 puede usarse para manejar, transportar y/o manipular el DMO 1160. Alternativamente, por ejemplo, el DMO 1160 puede desprenderse cuidadosamente de la guía interior 1160 y pasarse a una cámara de procesamiento de un biorreactor, por ejemplo, según se describe en detalle más adelante con referencia a la figura 22 o a diversos dispositivos de
15 transferencia (no se muestran) adaptados para transferir el DMO a un soporte diferente o a una cámara para su procesamiento posterior. Tales dispositivos de transferencia pueden incluir, por ejemplo, fórceps, agarradores de vacío o cualquier otro dispositivo mecánico capaz de asir el DMO 1160 y/o empujarlo para desprenderlo de la guía interior 1110. Además, es posible usar líquidos adecuados, como líquidos estériles, solos o en combinación con los medios indicados anteriormente para facilitar el desprendimiento del DMO de la guía interior 1160.

20 **[0094]** Según se indica en el bloque 1014, el procedimiento puede incluir también la retirada de la herramienta de corte, por ejemplo, el tubo cortador de cilindros 1150 de la porción de la piel 1120.

[0095] Los expertos en la técnica apreciarán que es posible implementar cualquier combinación de las acciones anteriores para realizar la recogida. Además, pueden usarse otras acciones o series de acciones.

[0096] El procedimiento de recogida puede incluir adicionalmente la estabilización y/o el soporte externo del
25 DMO que va a recogerse y/o del tejido en la proximidad del DMO que va a recogerse, por ejemplo, mediante el uso de un dispositivo y/o mecanismo de soporte externo, por ejemplo, además de la estabilización y/o el soporte interno de la dermis, por ejemplo, por la guía interior, según se describe más adelante.

[0097] También se hace referencia a la figura 12, que ilustra esquemáticamente una herramienta de pinzamiento estabilizante 1200 que puede usarse en combinación con un aparato de recogida de tejido dérmico.

30 **[0098]** La herramienta 1200 puede incluir un mecanismo de pinzamiento con bordes de pinzamiento 1210. Por ejemplo, la herramienta 1200 puede incluir una pinza de pellizco o unos fórceps, por ejemplo, según se conocen en la técnica. La herramienta 1200 puede incluir una pinza de resorte con una fuerza de pinzamiento constante o con una fuerza de pinzamiento variable controlable. La herramienta 1200 puede colocarse en la superficie de la piel en paralelo con la guía interior 1110 y a cada lado de esta, por ejemplo, de modo que cuando está cerrada, los bordes
35 de pinzamiento 1210 pueden situarse por debajo de la guía interior 1110. Cuando los bordes de pinzamiento 1210 están muy próximos entre sí pueden funcionar para estabilizar y/o soportar la guía interior 1110 y/o una porción de la piel 1240 asociada con el DMO que va a recogerse, de modo que el DMO puede estabilizarse mientras se corta con el tubo 1150. En este caso, el tubo cortador de cilindros 1150 puede empujarse a través de los bordes de pinzamiento 1210 de manera concéntrica o no concéntrica con la guía interior 1110 mientras se aplica fuerza. Los
40 bordes de pinzamiento 1210 pueden incluir al menos una o dos filas de dientes de sierra 1260 para un mejor pinzamiento de la porción 1240 y para reducir, por ejemplo, minimizar el movimiento lateral de la piel durante el proceso de extracción de cilindros.

[0099] Es posible usar otras herramientas y/o mecanismos para aplicar fuerza sobre la piel exterior con el fin de causar una compresión similar de la dermis que rodea la guía interior. Alternativamente, pueden usarse otros
45 dispositivos y/o procedimientos para la estabilización de la dermis que va a recogerse, como girar la guía interior y mantenerla en una posición sustancialmente fija con respecto a la rotación del tubo cortador de cilindros.

[0100] También se hace referencia a la figura 13, que ilustra esquemáticamente una vista de una sección transversal del tubo cortador de cilindros 1150 insertado coaxialmente sobre la guía interior y a lo largo de esta
50 1110.

[0101] La guía interior 1110 puede colocarse en la porción de la piel 1120 en una posición tal que un eje 1125 de la guía 1110 se sitúe sustancialmente en el centro del DMO 1160. En tal caso, el tubo cortador de cilindros 1150

puede alinearse sustancialmente de manera coaxial con la guía interior 1110, de modo que el DMO 1160 se inserta en la guía interior 1110 de manera aproximadamente simétrica.

- [0102]** Sin embargo, la guía interior y el tubo cortador de cilindros pueden colocarse en cualquier otra disposición adecuada. Por ejemplo, la guía interior puede colocarse en el espacio subcutáneo, de modo que el DMO que se desea recoger puede estar situado principalmente por encima de la guía interior y envuelto alrededor de esta. Por consiguiente, el tubo cortador de cilindros puede insertarse sobre la guía interior y/o guiarse de modo que la guía interior se sitúe próxima o en contacto con la superficie interna inferior del tubo cortador de cilindros a medida que este corta el DMO. En tal caso, la guía interior puede sostener el DMO, el cual puede reposar, por ejemplo, a lo largo de la superficie superior de la guía interior al extraerlo.
- 10 **[0103]** Los procedimientos manuales descritos anteriormente puede ser facilitados por un aparato integrado (no se muestra) configurado para llevar a cabo algunos o todos los procedimientos anteriores para la recogida del DMO. Por ejemplo, con respecto a una realización de un procedimiento de recogida, el aparato integrado puede estar configurado para permitir situar y guiar la inserción de la guía interior 1110, sujetar la herramienta de pinzamiento 1200, guiar la inserción del tubo cortador de cilindros 1150 y controlar su movimiento durante el proceso de corte y/o desprender el DMO 1160 sujeto a la guía interior 1110. Un aparato semejante puede hacer posible una operación relativamente sencilla al llevar a cabo un procedimiento de recogida.

- [0104]** Un procedimiento para la recogida de un DMO de un sujeto puede incluir la generación y/o el mantenimiento de una estructura de tejido cutáneo asociada con el DMO, por ejemplo, situada generalmente en un sitio de recogida seleccionado para la recogida del DMO, con una forma y posición deseadas, de modo que la herramienta de corte pueda ser capaz de separar al menos parte del DMO del tejido en la proximidad de dicho DMO. Por ejemplo, una porción de la epidermis en la proximidad del sitio seleccionado para la recogida puede levantarse, por ejemplo, sujetando al menos una parte de la porción de la epidermis a un área predefinida, por ejemplo, sustancialmente plana, de la superficie, de modo que al menos parte de la estructura de tejido cutáneo pueda levantarse y mantenerse en la forma y/o posición deseadas. De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares, la sujeción de la epidermis a la superficie predefinida puede incluir la aplicación de vacío, por ejemplo, según se escribe más adelante. Alternativa o adicionalmente, la sujeción de la epidermis a la superficie predefinida puede incluir la aplicación de un adhesivo a la superficie.

- [0105]** A continuación se hace referencia a las figuras 14a-14c, que ilustran esquemáticamente una vista frontal, una vista lateral y una vista desde arriba, respectivamente, de un aparato de recogida de tejido dérmico 1400 para la recogida de un DMO y a la figura 15, que ilustra esquemáticamente una vista de sección transversal de la implementación del aparato 1400 implementado para soportar externamente una estructura de tejido cutáneo que incluye un DMO 1510 en una posición deseada.

- [0106]** El aparato 1400 puede incluir una cámara de vacío, por ejemplo, una cámara longitudinal generalmente cilíndrica 1406, con una superficie de soporte superior 1430 conectada fluidicamente con una entrada de vacío 1402 por medio de varios canales 1404. La entrada de vacío 1402 puede conectarse fluidicamente con al menos una fuente de vacío, por ejemplo, una bomba de vacío (no se muestra), para proporcionar condiciones de vacío a la cámara 1406. La superficie 1430 y/o los canales 1404 pueden configurarse para permitir la sujeción a la superficie 1430 de al menos parte de una capa epidérmica 1508 asociada con el DMO 1510, por ejemplo, situada generalmente por encima del DMO 1510, cuando se aplica el vacío a la cámara 1406, por ejemplo, mediante la fuente de vacío.

- [0107]** El aparato 1400 puede incluir también un canal de guía 1416 para guiar una herramienta de corte, por ejemplo, un tubo cortador de cilindros 1520 y mantener la herramienta de corte en una situación predeterminada, por ejemplo, a una distancia predeterminada de la superficie superior 1430. Por ejemplo, la superficie superior de la herramienta de corte 1520 puede situarse, por ejemplo, a una distancia de aproximadamente 1 mm de la superficie superior 1430. En otra realización pueden usarse también otros intervalos como, por ejemplo, 0,3-2,0 mm. El canal 1416 puede incluir, por ejemplo, un canal generalmente cilíndrico con un diámetro ligeramente mayor que el diámetro exterior del tubo cortador de cilindros 1520. El tubo cortador de cilindros 1520 puede incluir una aguja cortadora de cilindros con un tamaño de, por ejemplo, entre 1 mm y 10 mm, por ejemplo 14G (que corresponde a un diámetro exterior de aproximadamente 2,11 mm) y con un borde de corte afilado simétricamente.

- 50 **[0108]** La superficie 1430 puede ser plana, generalmente curvada o puede tener cualquier otra forma. Por ejemplo, en una realización, la superficie 1430 puede tener un radio de curvatura de aproximadamente 3,5 mm. En una realización la cámara 1406 puede tener una anchura de, por ejemplo, aproximadamente 4 mm. Además, en algunas realizaciones la cámara 1406 puede tener una altura de, por ejemplo, aproximadamente 5 mm. En otras realizaciones pueden usarse también otros intervalos como, por ejemplo, de 3-25 mm para el radio de curvatura de la superficie 1430 y/o para la anchura y/o la altura de la cámara 1406, por ejemplo, en algunas realizaciones es posible usar cualquier dimensión deseada en el intervalo de 3-25 mm. La longitud de la cámara 1406 puede ser

generalmente similar a la longitud del DMO que se recoge, por ejemplo, de aproximadamente 30 mm de longitud; sin embargo, es posible usar otros intervalos, por ejemplo, de 5-100 mm para la longitud de la cámara.

[0109] El aparato 1400 puede incluir dos canales 1408 situados al menos parcialmente a lo largo de dos lados de la cámara 1406, respectivamente, para permitir el pinzamiento de la capa epidérmica 1508 según se describe más adelante. Los canales 1408 pueden colocarse, por ejemplo, centrados a una altura deseada, por ejemplo, a aproximadamente la misma altura a la que va a recogerse el centro del DMO. En una realización, el centro de los canales 1408 puede colocarse a una altura de aproximadamente 2 mm por debajo de la superficie superior 1430, de modo que el pinzamiento pueda estabilizar y/o soportar el tejido que se corta. De acuerdo con estas realizaciones ejemplares, el aparato 1400 puede incluir también dos elementos membranosos flexibles 1412 a cada lado de la superficie interior o de la superficie exterior de los canales 1408 para permitir el pinzamiento exterior del tejido sin afectar sustancialmente a las condiciones de vacío aplicadas a la cámara 1406. El aparato 1400 puede no incluir elementos 1412 ni/o canales 1408.

[0110] Un procedimiento para la recogida del DMO 1510 mediante el aparato 1400 puede incluir la realización de dos incisiones (no se muestran), por ejemplo, haciendo dos cortes de lanceta mediante un escalpelo en una porción de la piel asociada con el DMO 1510 a una distancia predeterminada, por ejemplo, a aproximadamente 30 mm, que puede corresponder a los puntos por los que se desea que el tubo cortador de cilindros 1520 entre y salga de la epidermis 1508 ("los sitios de penetración de entrada y salida"). Las incisiones pueden hacerse con el fin de asegurar que sustancialmente no habrá ningún componente epidérmico en los dos extremos del DMO recogido 1510 y/o para mantener la forma deseada de los sitios de penetración, de modo que puedan sanar eficientemente, es decir, rápidamente y/o dejando cicatrices relativamente pequeñas. El procedimiento puede incluir también la puesta en contacto del aparato 1400 con la capa epidérmica 1508 ("el sitio de recogida"), de modo que las incisiones se sitúen por debajo de la cámara 1406, es decir, entre los puntos 1410 y 1414. Las incisiones pueden situarse en los puntos 1410 y/o 1414, respectivamente, o pueden situarse entre los puntos 1410 y 1414 para ayudar a forzar la "apertura" de los cortes de lanceta una vez que se aplica el vacío a la cámara 1406. De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares, el aparato 1400 puede incluir opcionalmente un mecanismo configurado para crear los cortes de lanceta, por ejemplo, lancetas accionadas por resortes que producen los cortes de lanceta, por ejemplo después de colocar el aparato 1400 en el sitio de recogida y antes de aplicar el vacío a la cámara 1406.

[0111] El procedimiento puede incluir también la inserción del tubo cortador de cilindros 1520 en el canal 1416. El tubo cortador de cilindros 1520 puede conectarse, por ejemplo, por medio de un conector, por ejemplo, un portabrocas Jacobs o un soporte de fricción, a un taladro médico o a cualquier otra herramienta y/o mecanismo adecuado, por ejemplo, el taladro 1170 (figura 11), capaz de girar el tubo cortador de cilindros 1520. Opcionalmente, la velocidad de rotación del taladro puede variar de manera oscilante, es decir, la dirección de rotación puede variar periódicamente entre el "sentido de las agujas del reloj" y el "sentido contrario a las agujas del reloj".

[0112] El procedimiento puede incluir también la aplicación de vacío a la cámara 1406, por ejemplo, por activación de la fuente de vacío. En consecuencia, la estructura de tejido cutáneo puede ser aspirada a la cámara 1406 y la epidermis 1508, por ejemplo, entre los cortes de lanceta, puede quedar firmemente sujeta contra la superficie 1430. La epidermis 1508, la dermis 1506 y/o los componentes de tejido adiposo 1504 pueden ser aspirados también a la cámara 1406, dependiendo del espesor de cada una de estas capas de tejido y de las dimensiones de la cámara 1406. Por lo tanto, las dimensiones de la cámara 1406 pueden diseñarse de acuerdo con el espesor anticipado de una o más de las capas de tejido y/o, por ejemplo, según se describe en este documento, puede aplicarse un pinzamiento exterior de modo que el tejido adiposo 1504 aspirado a la cámara de vacío 1406 pueda impulsarse hacia abajo y sustancialmente fuera de la cámara 1406.

[0113] El procedimiento puede incluir además el giro del tubo cortador de cilindros 1520, por ejemplo, mediante el taladro 1170 (figura 11) a una velocidad de rotación relativamente alta, por ejemplo, de más de 1.000 rpm, por ejemplo, de entre 1.000 rpm y 10.000 rpm. Por ejemplo, el tubo cortador de cilindros 1520 puede hacerse girar a una velocidad de rotación superior a 2.000 rpm, por ejemplo, de aproximadamente 7.000 rpm. Alternativamente, puede usarse una velocidad de rotación relativamente baja de menos de 1.000 rpm o ninguna rotación, según se describe anteriormente. El procedimiento puede incluir también el avance del tubo cortador de cilindros 1520 a lo largo de la cámara de vacío 1406, por ejemplo, al menos a lo largo de toda la longitud de la cámara 1406. El tubo cortador de cilindros 1520 puede guiarse a través de un canal 1416 con el fin de asegurar que el microórgano dérmico 1510 se recoja de aproximadamente la misma profundidad en la estructura de tejido cutáneo a lo largo de la cámara 1406. El tubo cortador de cilindros 1520 puede hacerse avanzar manualmente o mediante un accionador motorizado (no se muestra), por ejemplo, para controlar la velocidad de avance del tubo cortador de cilindros 1520.

[0114] El procedimiento puede incluir también la separación del DMO 1510 del tejido que rodea dicho DMO 1510. Por ejemplo, el aparato 1400 puede incluir una extensión 1418, por ejemplo, con una longitud de entre 1 mm y 5 mm y un radio sustancialmente igual al radio del canal 1416, situada sustancialmente opuesta al canal 1416, de

modo que el tubo cortador de cilindros 1520 puede avanzar en la extensión 1418 después de atravesar la cámara 1406. Alternativamente, puede colocarse una superficie de corte 1440, por ejemplo, formada por silicona u otro material adecuado en la extensión 1418, de modo que el tubo cortador de cilindros puede cortar en la superficie 1440 para separar el DMO recogido. Adicionalmente, es posible aplicar vacío dentro del tubo cortador de cilindros 1520, por ejemplo desde su extremo posterior, de modo que el DMO 1510 puede ser aspirado activamente dentro del tubo cortador de cilindros 1520, lo que impulsa la separación final del DMO del tejido circundante.

[0115] El procedimiento puede incluir además la retirada del tubo cortador de cilindros 1520, con el DMO 1510 incluido de su interior, del aparato 1400.

[0116] Se hace referencia a la figura 16 que ilustra esquemáticamente una vista de sección transversal del aparato 1400 implementado para soportar externamente una estructura de tejido cutáneo en una posición deseada.

[0117] En la figura 16 puede conseguirse una mejora de la estabilización de la dermis 1506 y/o una mejora en la prevención de la recogida de grasa 1504 en la cámara de vacío 1406 mediante el pinzamiento externo de la estructura de tejido cutáneo soportada dentro de la cámara de vacío. Por ejemplo, puede implementarse una herramienta de pinzamiento 1600, por ejemplo, análoga a la herramienta de pinzamiento descrita anteriormente con referencia a la figura 12, para “pellizcar” la estructura de tejido cutáneo soportada dentro de la cámara de vacío 1406, por ejemplo, simétricamente. Los dos extremos de pinzamiento 1502 de la herramienta de pinzamiento 1600 pueden insertarse en los canales 1408, respectivamente. La herramienta 1600 puede cerrarse de modo que los extremos de pinzamiento 1502 puedan presionar contra los elementos flexibles 1412. Por lo tanto, la estructura de tejido cutáneo en la cámara 1406 puede pinzarse por los lados sin afectar sustancialmente a las condiciones de vacío en la cámara 1406. La fuerza de pinzamiento aplicada por los extremos de pinzamiento 1502 puede corresponder, por ejemplo, a una fuerza constante o variable de un resorte 1512 o de otro dispositivo similar.

[0118] Aunque la descripción anterior puede referirse a una cámara de vacío con una forma y/o tamaño generalmente constantes a lo largo de su eje longitudinal, los expertos en la técnica apreciarán que la cámara de vacío puede tener cualquier otra forma y/o tamaño predeterminados, por ejemplo, según se describe más adelante.

[0119] A continuación se hace referencia a la figura 17 que ilustra esquemáticamente un aparato de recogida de tejido dérmico 1700.

[0120] El aparato 1700 puede incluir una cámara de vacío 1701 que incluye un saliente elevado 1706. El saliente elevado 1706 puede tener una forma y/o tamaño predeterminados adaptados, por ejemplo, para permitir la creación de una “meseta” de una única capa de tejido de la piel en una orientación generalmente plana, elevada por encima de la trayectoria de un tubo cortador de cilindros 1716. Por ejemplo, la sección 1706 puede tener mayor altura que las otras secciones de la cámara 1701, de modo que es posible aspirar una capa adiposa 1718 a la sección 1706 y soportarla a lo largo de la trayectoria del tubo cortador de cilindros 1716. Como resultado, después de recoger un DMO de una longitud predeterminada, el tubo cortador de cilindros 1716 puede hacerse avanzar ligeramente en la capa adiposa 1718, separando así el DMO recogido del tejido que rodea dicho DMO. El DMO recogido puede permanecer dentro del tubo cortador de cilindros 1716 al retirarlo del cuerpo. La configuración del aparato 1700 puede eliminar la necesidad de realizar una incisión de “salida” en la piel, por ejemplo, según se ha descrito anteriormente, lo que permite la recogida de un DMO con una única incisión.

[0121] El aparato 1700 puede incluir también un tope 1708 en el taladro para permitir avanzar manualmente el tubo cortador de cilindros 1716 una distancia predeterminada a lo largo de la cámara 1701, por ejemplo, hasta una posición en la que el tubo cortador de cilindros 1716 ha avanzado ligeramente dentro del tejido adiposo 1718.

[0122] A continuación se hace referencia a la figura 18 que ilustra esquemáticamente un aparato de recogida 1800 y a la figura 19 que ilustra esquemáticamente una vista de sección transversal del aparato 1800 implementado para la recogida de un DMO 1830.

[0123] Para la recogida de un DMO pueden utilizarse dispositivos para biopsias centrales similares a los usados, por ejemplo en aplicaciones de biopsias de cáncer de mama, según se describe más adelante. El aparato 1800 puede incluir una herramienta de corte 1808, por ejemplo, según se describe anteriormente y un trocar de recogida subcutánea (HST) 1806, por ejemplo, una aguja hipodérmica con una punta afilada 1804 y un diámetro interior adecuado, por ejemplo, ligeramente mayor que el diámetro exterior de la herramienta de corte 1808, de modo que la herramienta de corte 1808 pueda insertarse dentro del HST 1806 de manera sustancialmente coaxial con este. El HST 1806 puede incluir una muesca recortada (“ventana”) 1802 de una profundidad adecuada, por ejemplo, de 1 mm o más, y una longitud adecuada, por ejemplo sustancialmente igual a la longitud deseada del DMO que va a recogerse.

[0124] En la figura 18, puede realizarse una única incisión, por ejemplo, un corte de lanceta, por ejemplo, mediante un escalpelo, a través de la que puede insertarse el HST 1806 junto con la herramienta de corte 1808, por

ejemplo, como una única unidad, en la posición deseada por debajo de la piel o en esta, preferentemente en el espacio subcutáneo, con la muesca 1802 orientada hacia arriba, hacia la capa dérmica 1840. La herramienta de corte 1801 puede colocarse dentro del HST 1806 durante la penetración, de modo que la ventana recortada 1802 puede "cerrarse" para permitir una penetración generalmente suave del HST 1806. La herramienta 1808 y el HST 5 1806 insertado en ella pueden desplazarse a lo largo de la superficie de separación subcutánea a lo largo de la longitud de la muesca 1802 y el extremo 1804 no puede salir a través de la superficie de la piel. Una vez colocada apropiadamente, la herramienta 1808 puede retraerse para exponer la muesca 1802 y permitir que el tejido dérmico rellene sustancialmente dicha muesca. Para facilitar que la dermis rellene sustancialmente la muesca 1802 puede aplicarse una presión apropiada en la superficie de la piel, por ejemplo, mediante una herramienta de pinzamiento 10 adecuada, por ejemplo, según se describe anteriormente con referencia a la figura 12 y/o puede aplicarse vacío desde dentro del HST 1802 mediante un colector de vacío (no se muestra), por ejemplo, situado por debajo de la muesca recortada 1802. La herramienta 1808 puede conectarse a un motor, por ejemplo, según se describe anteriormente, para girar la herramienta 1808 a una velocidad de rotación apropiada para el corte del tejido dérmico, por ejemplo, una velocidad de rotación relativamente alta, por ejemplo, una velocidad superior a 1.000 rpm, por ejemplo, de entre 1.000 rpm y 10.000 rpm. Por ejemplo, la herramienta 1808 puede hacerse girar a una velocidad de rotación superior a 2.000 rpm, por ejemplo, de aproximadamente 7.000 rpm. La herramienta 1808 puede hacerse avanzar entonces, por ejemplo, manual o automáticamente, por ejemplo, hasta sobrepasar el extremo de la ventana recortada 1802 para cortar el DMO 1830 dentro de la muesca 1802. Una vez que se ha finalizado, los movimientos de avance y de giro de la herramienta 1808 pueden detenerse y dicha herramienta 1808 puede retraerse con el 20 DMO recogido 1830 en su interior. El HST 1806 puede extraerse entonces del sitio de recogida. El DMO 1830 puede extraerse de la herramienta de corte 1808, por ejemplo, mediante una jeringa para impulsar un líquido estéril, por ejemplo, disolución salina, a través de la herramienta 1808 o mediante una fuente de vacío para aspirar el DMO 1830 desde un extremo de la herramienta de corte 1808 (no se muestra).

[0125] Los expertos en la técnica apreciarán que el aparato 1800 puede permitir la recogida del DMO 25 mediante la realización de una única incisión. Además, el aparato 1800 puede aplicarse eficientemente para la recogida de un DMO de zonas con una piel relativamente gruesa, por ejemplo, de una región de la espalda del donante.

[0126] Los expertos en la técnica apreciarán que los procedimientos y/o los aparatos de recogida, por ejemplo, según se describen anteriormente, pueden incluir la introducción de dispositivos finos de corte de tejido 30 dentro de la dermis. Por lo tanto, los procedimientos y/o los aparatos de recogida pueden permitir la recogida del DMO con un daño relativamente mínimo de la superficie exterior de la piel y, por consiguiente, pueden proporcionar un procedimiento mínimamente invasivo para la recogida de los tejidos deseados.

[0127] Descritos en este documento, pueden referirse a procedimientos y/o aparatos para la recogida de un DMO, los expertos en la técnica apreciarán que, de acuerdo con otras realizaciones, al menos algunos de los 35 procedimientos y/o los aparatos pueden implementarse para cualquier otro procedimiento, por ejemplo, procedimientos de cirugía plástica, procedimientos dermatológicos o cualquier otro procedimiento que incluya la recogida de tejidos. Por ejemplo, los procedimientos y/o los aparatos pueden implementarse para la recogida de tejido dérmico para usar, por ejemplo, en una posterior implantación, como material de relleno.

[0128] En este documento se desvela un sistema y un procedimiento proporcionados para el manejo o el 40 procesamiento *ex vivo* ("*in vitro*") de microórganos dérmicos. El tejido dérmico que se ha recogido como un MO directo puede dejarse en su guía interior como soporte para dicho MO. En estas realizaciones, la guía interior puede usarse para mantener la posición y la orientación de los MO durante su procesamiento posterior. En otras realizaciones, los MO dérmicos pueden extraerse de la guía interior y colocarse directamente en pocillos de cultivo de tejidos o en las cámaras de transducción de un biorreactor, según se describe en detalle más adelante, por 45 ejemplo, con referencia a la figura 22. En algunas realizaciones, por ejemplo, si el DMO permanece en el tubo cortador de cilindros al retirarlo de la piel, el DMO puede ser expulsado del tubo cortador de cilindros mediante el uso de un líquido compatible, por ejemplo, disolución salina o medio de cultivo, aplicado en el extremo posterior del tubo cortador de cilindros. Esto puede realizarse de modo que se expulse directamente el DMO a una cámara del biorreactor, por ejemplo, según se describe más adelante. Alternativamente, puede aplicarse vacío al extremo 50 posterior del tubo cortador de cilindros para "aspirar" el DMO, por ejemplo, directamente a una cámara del biorreactor.

[0129] Se proporcionan un sistema y un procedimiento para la implantación de un DTMO. Después de la producción y/o el procesamiento de un DMO, por ejemplo, mediante la modificación genética del DMO, el DMO modificado o DTMO puede reimplantarse en el paciente, por ejemplo, para un tratamiento a base de proteínas o 55 ARN. El número de DTMO totales o parciales que se implanten puede quedar determinado por la dosis terapéutica deseada de la proteína secretada. Los DTMO pueden implantarse subcutáneamente o en cualquier otro lugar dentro del cuerpo. La implantación subcutánea mediante el uso de un trocar de aguja, por ejemplo, puede permitir que el DTMO permanezca en forma lineal en el espacio subcutáneo. La forma lineal de la implantación puede facilitar la

localización en caso de que se requiera la ablación posterior del DTMO, por ejemplo, con el fin de detener el tratamiento o de reducir la dosis de la proteína terapéutica. También pueden usarse otros patrones geométricos de implantación conocidos. La implantación lineal también puede facilitar la integración del tejido dérmico en el tejido circundante.

5 **[0130]** A continuación se hace referencia a la figura 20 que ilustra esquemáticamente un diagrama de flujo de un procedimiento de implantación de un DTMO.

[0131] Según se indica en el bloque 2002, puede administrarse opcionalmente un anestésico local en el sitio deseado de implantación.

10 **[0132]** Según se indica en el bloque 2004, el DTMO, opcionalmente junto con solución salina estéril circundante puede aspirarse en un vehículo portador, por ejemplo, una aguja de implantación, por ejemplo, sujeta a una jeringa. La jeringa puede tener cualquier diámetro adecuado, por ejemplo, entre calibre 17 y calibre 12. Opcionalmente, una punta de la aguja puede tener una corta extensión de tubo de silicona o similar fijado a esta, para facilitar la aspiración del DTMO en la cánula de la aguja al retraer el émbolo de la jeringa.

15 **[0133]** Según se indica en el bloque 2006, la aguja de implantación cargada con el DTMO puede introducirse en la piel, por ejemplo, sin la extensión de tubo de silicona, en su destino subcutáneo a lo largo de una distancia aproximadamente equivalente a la longitud del DTMO.

[0134] Según se indica en el bloque 2008, la aguja de implantación puede salir a través de la superficie de la piel por el extremo distal del sitio de implantación.

20 **[0135]** El procedimiento puede incluir la aplicación de presión sobre el microorganismo terapéutico dérmico aspirado, de modo que dicho microorganismo terapéutico dérmico salga del vehículo portador al sitio de implantación.

[0136] Según se indica en el bloque 2010, la punta del DTMO puede asirse en el punto de salida con una herramienta de agarre, por ejemplo unas pinzas.

25 **[0137]** Según se indica en el bloque 2012, la aguja de implantación puede retraerse a través del espacio subcutáneo, liberando el DTMO de la aguja de implantación y depositando dicho DTMO linealmente a lo largo del tracto de la aguja. Si es necesario, puede proporcionarse asistencia para facilitar la liberación del DTMO, por ejemplo, empujando hacia abajo ligeramente el émbolo de la jeringa durante la retracción.

[0138] Según se indica en el bloque 2014, una vez que el DTMO se ha colocado en su sitio, la herramienta de agarre puede soltar la punta de dicho DTMO.

30 **[0139]** Se proporcionan un sistema y un procedimiento para la demarcación y localización *in vivo* de los microorganismos dérmicos implantados. La identificación de la situación de una implantación subcutánea o de una implantación en cualquier otro lugar del cuerpo de un tejido procesado, como un DTMO, puede ser importante, por ejemplo, en el caso de que sea necesario detener el tratamiento proteico o disminuir la dosis de la proteína secretada. Por ejemplo, la terminación o la titulación de la dosis pueden realizarse mediante la extracción de uno o más DTMO en su totalidad y/o mediante la ablación de uno, una porción de uno o de más de uno de los DTMO
35 implantados. Con el fin de identificar un DTMO implantado subcutáneamente, de acuerdo con una realización, el DTMO puede colorearse antes de su implantación mediante una tinta o un colorante biocompatible e inerte que contenga, por ejemplo, un cromóforo que puede ser visible a simple vista o puede requerir condiciones de iluminación especiales para su visualización. De esta manera, un DTMO puede distinguirse del tejido circundante por inspección visual y/o mediante el uso de procedimientos de realce de la imagen.

40 **[0140]** De acuerdo con una realización, la superficie periférica de un DTMO puede estar recubierta, por ejemplo, con partículas de carbono biocompatibles, tinta de tatuajes biocompatible u otros materiales adecuados. Una vez implantado subcutáneamente, el DTMO puede ser visible a simple vista o con un dispositivo adecuado de realce de la imagen. Otras formas de realzar la visibilidad de un DTMO implantado pueden incluir el uso de una potente fuente luminosa sobre la superficie de la piel o pellizcar la piel y dirigir la fuente luminosa a la piel por un
45 lado, de modo que la piel pueda parecer translúcida y el DTMO teñido hacerse más visible. Alternativamente, el colorante puede ser fluorescente, visible solamente al iluminarlo con luz UV, como al usar esferas de plástico fluorescentes.

50 **[0141]** De acuerdo con otra realización, la situación de un DTMO implantado subcutáneamente puede identificarse mediante la coimplantación de una estructura biocompatible junto con el DTMO. Un ejemplo de una estructura biocompatible semejante es una sutura de nailon de una sola hebra no reabsorbible, de uso común en numerosos procedimientos quirúrgicos. Una sutura semejante puede implantarse en el mismo tracto de implantación que el DTMO o puede implantarse directamente por encima del DTMO en la dermis superior, de modo que pueda

determinarse la situación espacial del DTMO por la situación de la sutura. Además, puede saberse que la profundidad del DTMO corresponde a la profundidad del espacio subcutáneo. La sutura puede ser visible a simple vista, observable mediante la asistencia de medios de iluminación y/o observable con la ayuda de otros procedimientos adecuados de obtención de imágenes como ultrasonidos. Alternativamente, la sutura puede ser fluorescente y visible a través de la piel con la iluminación UV adecuada. Alternativamente, la sutura puede ser de un material absorbible, de modo que puede permitir la determinación de la localización durante un periodo de tiempo deseado, como unos pocos meses.

[0142] De acuerdo con otra realización, el DTMO puede modificarse o manipularse genéticamente para incluir un gen para expresar un marcador fluorescente u otro marcador que pueda ser visualizado. Por ejemplo, el DTMO puede modificarse con el gen GTP (proteína verde fluorescente) o el gen indicador de la luciferasa, los cuales, por ejemplo, pueden expresarse junto con el gen de la proteína terapéutica. Así, el DTMO puede visualizarse de manera no invasiva mediante la luz UV apropiada u otra iluminación y condiciones de obtención de imágenes adecuadas.

[0143] Se proporcionan un sistema y un procedimiento para la extracción o la ablación de los DTMO implantados. Por ejemplo, en caso de que el tratamiento de un paciente a base de un DTMO deba terminarse o deba disminuirse la secreción de la proteína, es posible la extracción parcial o total de cada DTMO implantado o su ablación parcial o total. Una realización para la extracción de un DTMO tiene lugar por medio de un tubo cortador de cilindros similar o de diámetro ligeramente mayor que el usado para la recogida directa del DMO.

[0144] Como puede observarse con referencia a la figura 21, en el bloque 2102 puede determinarse la situación del DTMO implantado subcutáneamente. En el bloque 2103 puede administrarse opcionalmente un anestésico local en el sitio de extracción del DTMO. En el bloque 2104 puede insertarse una guía interior subcutáneamente a lo largo de la longitud del DTMO para recoger un cilindro de tejido que incluye el DTMO. En el bloque 2106 una aguja cortadora de cilindros del mismo o de mayor diámetro que la aguja de implantación (por ejemplo, de calibre 11 o similar) puede insertarse concéntricamente sobre la guía interior. En el bloque 2108 puede recogerse un cilindro de tejido que incluye el DTMO. En el bloque 2110, la guía interior con el cilindro de tejido y la aguja cortadora de cilindros pueden extraerse de la piel con el DTMO. En una realización, esta estrategia de corte de cilindros puede combinarse con una succión por vacío para facilitar la extracción del material cortado del cuerpo.

[0145] Es posible usar procedimientos mínimamente invasivos o no invasivos para la ablación del DTMO *in situ* con el objeto de hacer que el procedimiento sea menos traumático y menos invasivo para el paciente. En una realización, en el caso de un DTMO teñido puede usarse un láser, por ejemplo, un láser YAG no invasivo. Por ejemplo, la energía del láser YAG puede ser selectivamente absorbida por el cromóforo, de modo que la energía se dirige principalmente al DTMO, causando un daño mínimo al tejido circundante. También pueden usarse otras fuentes de energía luminosa.

[0146] La ablación del DTMO puede realizarse mediante el suministro de energía destructiva desde una sonda mínimamente invasiva insertada en el espacio subcutáneo a lo largo de la longitud del DTMO. Una sonda semejante puede permitir el suministro de diversos tipos de energía, como radiofrecuencia, energía criogénica, microondas, calor resistivo, etc. Puede usarse una estructura coimplantada, como una sutura, para determinar la situación del DTMO, con lo que se permite la inserción de la sonda subcutáneamente, por ejemplo, a lo largo de la sutura o directamente por debajo de esta. En tal caso, por ejemplo, la energía destructiva puede suministrarse mientras la sutura todavía permanece en su sitio. Alternativamente, es posible extraer la sutura después de colocar la sonda y antes de suministrar la energía destructiva. La cantidad de energía aplicada puede ser la requerida para la desnaturalización de las proteínas en el tejido, como durante la coagulación por diatermia. Adicional o alternativamente, la cantidad de energía aplicada puede ser tanta como la usada en los dispositivos de corte electroquirúrgicos que carbonizan el tejido. Por supuesto, es posible usar otros medios de localización y otros medios para suministrar energía destructiva.

[0147] Después de haber recogido un DMO, opcionalmente dicho DMO puede alterarse genéticamente. Para la alteración genética del tejido puede usarse cualquier metodología conocida en la técnica. Un procedimiento ejemplar es la inserción de un gen en las células del tejido con un vector vírico recombinante. Puede usarse cualquiera de una serie de vectores diferentes, como vectores víricos, vectores plasmídicos, ADN lineal, etc., según se conocen en la técnica, para la introducción en las células y/o el tejido diana de un fragmento de ácido nucleico exógeno que codifica un agente terapéutico. Estos vectores pueden insertarse, por ejemplo, mediante el uso de cualquiera de los procedimientos de infección, transducción, transfección, transfección por medio de fosfato de calcio, transfección por medio de DEAE-dextrano, electroporación, transfección por medio de liposomas, administración biolística de genes, administración liposómica de genes mediante liposomas fusogénicos y aniónicos (que son una alternativa al uso de liposomas catiónicos), inyección directa, absorción por medio de receptores, magnetoporación, ultrasonidos y otros según se conocen en la técnica. Esta inserción de genes se consigue mediante la introducción del vector en la proximidad del DMO, de modo que el vector puede reaccionar con las células del DMO. Una vez que el fragmento de ácido nucleico exógeno se ha incorporado en las células, puede

cuantificarse la producción y/o la tasa de secreción del agente terapéutico codificado por dicho fragmento de ácido nucleico.

[0148] De acuerdo con algunas realizaciones ejemplares, la modificación genética del DMO puede modificar el perfil de expresión de un gen endógeno. Esto puede conseguirse, por ejemplo, mediante la introducción de un
5 potenciador o de un elemento regulador reprimible o inducible para controlar la expresión del gen endógeno.

[0149] En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para la administración de un producto génico de interés en un sujeto mediante la implantación del DMO modificado genéticamente en el sujeto.

[0150] Según se indica anteriormente, el DMO puede estar en contacto con una disolución nutritiva durante el proceso. Por lo tanto, un agente terapéutico generado por DTMO puede secretarse a la disolución, donde puede
10 medirse su concentración. El gen de interés puede ser cualquier gen que codifique cualquier molécula de ARN (codificante o no codificante), péptido, polipéptido, glucoproteína, lipoproteína o una combinación de estas o cualquier otro polipéptido modificado posteriormente. En una realización de la invención, el gen de interés puede expresarse de manera natural en la muestra de tejido. En otra realización de esta invención, la muestra de tejido puede manipularse genéticamente de modo que al menos una célula exprese el gen de interés, que no se expresa
15 de manera natural en la célula o que tiene un perfil de expresión alterado dentro de la célula.

[0151] Según se usa en este documento, el término “ácido nucleico” se refiere a polinucleótidos u oligonucleótidos como el ácido desoxirribonucleico (ADN) y, en caso apropiado, ácido ribonucleico (ARN) o un mimético de estos. También deberá entenderse que el término incluye, como equivalentes, los análogos de ARN o ADN, preparados a partir de análogos de nucleótidos y, según sea aplicable a la realización que se describa,
20 polinucleótidos monocatenarios (codificantes o no codificantes) y bicatenarios. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de las bases nitrogenadas naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto), así como oligonucleótidos que tienen porciones no naturales con funcionalidad similar. Frecuentemente, tales oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren a las formas nativas debido a propiedades deseables como, por ejemplo, un aumento de la absorción celular, una mayor afinidad por la diana del ácido nucleico y un aumento de
25 la estabilidad en presencia de nucleasas.

[0152] Como saben los expertos en la técnica, los términos “proteína”, péptido” o “polipéptido” significan un polímero lineal de aminoácidos unidos en una secuencia específica por enlaces peptídicos. Según se usa en este documento, el término “aminoácido” se refiere a la forma estereoisómera D o L del aminoácido, a menos que se denomine específicamente de otro modo. También quedan comprendidas proteínas equivalentes o péptidos
30 equivalentes, por ejemplo, con la actividad biológica de la proteína supresora tumoral natural purificada. Las “proteínas equivalentes” y los “polipéptidos equivalentes” se refieren a compuestos que se apartan de la secuencia lineal de las proteínas o polipéptidos naturales, pero que tienen sustituciones de aminoácidos que no modifican su actividad biológica. Estos equivalentes pueden diferir de las secuencias nativas por la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos relacionados, por ejemplo, aminoácidos de carga similar, o por la sustitución o la
35 modificación de cadenas laterales o grupos funcionales.

[0153] La proteína, péptido, polipéptido, glucoproteína o lipoproteína pueden ser, sin limitación, cualquiera de las proteínas siguientes o diversas combinaciones de estas: una proteasa, una lipasa, una ribonucleasa, una desoxirribonucleasa, un factor de coagulación sanguínea, una enzima citocromo p450, un factor de transcripción, un componente del CMH, una citocina, una interleucina, una BMP, una quimiocina, un factor de crecimiento, una
40 hormona, una enzima, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena sencilla, una oxidoreductasa, un p450 una peroxidasa, una hidrogenasa, una deshidrogenasa, una catalasa, una transferasa, una hidrolasa, una isomerasa, una ligasa, una aminoacil-ARNt-sintetasa, una cinasa, una fosfoproteína, un transposón mutador, una oxidoreductasa, una colinesterasa, una glucoamilasa, una glucosil-hidrolasa, una transcarbamilasa, una nucleasa, una meganucleasa, una ribonucleasa, una ATPasa, una peptidasa, una sintetasa de nucleótidos cíclicos, una
45 fosfodiesterasa, una fosfoproteína, una proteína asociada a ADN o ARN, una proteína del grupo de alta movilidad, una proteína Pax, una histona, una polimerasa, una proteína reparadora de ADN, una proteína ribosómica, una proteína de transporte electrónico, una globina, una metalotioneína, una proteína de transporte de membrana, una proteína estructural, un receptor, un receptor de la superficie celular, un receptor nuclear, una proteína G, un receptor olfativo, un receptor de canal iónico, un canal, un receptor de tirosina-cinasa, una molécula o receptor de
50 adhesión celular, un fotorreceptor, un péptido activo, un inhibidor de proteasas, una chaperona, una chaperonina, una proteína asociada al estrés, un factor de transcripción y una proteína quimérica.

[0154] En una realización, la cantidad de proteína secretada por el DMO de la invención es de al menos 1,6 µg/DTMO y día en el día antes de la implantación.

[0155] En una realización de esta invención, el gen de interés puede codificar eritropoyetina o una proteína
55 equivalente a esta.

[0156] En otra realización de la invención, el gen de interés puede codificar, sin limitación, cualquiera de las proteínas siguientes, cualquier combinación de las proteínas siguientes y cualquier equivalente de estas: insulina, tripsinógeno, quimotripsinógeno, elastasa, amilasa, factor tímico del suero, factor tímico humoral, timopoyetina, gastrina, secretina, somatostatina, sustancia P, hormona del crecimiento, una somatomedina, un factor estimulante de colonias, eritropoyetina, factor de crecimiento epidérmico, factor eritropoyético hepático (hepatopoyetina), un factor de crecimiento de células hepáticas, una interleucina, un factor de crecimiento negativo, factor de crecimiento de fibroblastos y factor de crecimiento transformante de la familia β , interferón α , interferón β , interferón γ , hormona de crecimiento humana, G-CSF, GM-CSF, receptor de TNF, PDGF, AAT, VEGF, superóxido-dismutasa, interleucina, TGF- β , NGF, CTNF, PEDF, NMDA, AAT, actina, activina β A, activina β B, activina β C, activina β E, adenosina-desaminasa, β -agarasa, albúmina, albúmina (HSA), alcohol-deshidrogenasa, aldolasa, alfimeprasa, α 1-antitripsina, α -galactosidasa, α 1-glucoproteína ácida (AGP), α 1-antiquimotripsina, α 1-antitripsina (AT), α 1-microglobulina (A1M), α 2-macroglobulina (A2M), α -fetoproteína, α -galactosidasa, D-aminoácido-oxidasa, L-aminoácido-oxidasa, α -amilasa, β -amilasa, angiostatina, enzima de conversión de la angiotensina, anquirina, apolipoproteína, APO-SAA, arginasa, asparraginasas, aspartil-aminotransferasa, factor natriurético atrial (Anf), péptido natriurético atrial (Anp), avidina, β 2-glucoproteína 1, β 2-microglobulina, β -N-acetilglucosaminidasa (β -NAG), β -amiloides, proteína natriurética cerebral (Bnp), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), cadherina E, Calc a, Calc b, calcitonina, calciclina, caldesmona, calgizarina, calgranulina A, calgranulina C, calmodulina, calreticulina, calvasculina, anhidrasa carbónica, carboxipeptidasa, carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B, carboxipeptidasa Y, troponina cardiaca I, troponina cardiaca T, caseína, α -catalasa, cateninas, catepsina D, CD95L, CEA, celulasa, proteína centromérica B, ceruloplasmina, ceruplasmina, colecistoquinina, colesterol-esterasa, colinesterasa, acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, gonadotropina coriónica (MCG), gonadotropina coriónica β -CORE (BchCG), quimotripsina, quimotripsinógeno, creatina-cinasa, K-BB, CK-MB (creatina-cinasa MB), CK-MM, proteína de unión a fosfolípidos de células claras, clostripaína, clusterina, CNTF, colágeno, colagenasa, colágenos (tipo I-VI), factor estimulante de colonias, complemento C1q, complemento C3, complemento C3a, complemento C3b- α , complemento C3b- β , complemento C4, complemento C5, factor del complemento B, concanavalina A, corticoliberina, hormona liberadora de corticotropina, proteína C reactiva (CRP), péptido natriurético de tipo C (Cnp), cistatina C, dímero D, δ 1, cinasa similar a δ 1 (Dik1), desoxirribonucleasa, desoxirribonucleasa I, desoxirribonucleasa II, ácidos desoxirribonucleicos, dersalazina, dextranasa, diaforasa, ADN-ligasa de T4, ADN-polimerasa 1, ADN-polimerasa de T4, EGF, elastasa, elastina, factor de crecimiento endotelial vascular derivado de glándulas endocrinas (EG-VEGF), elastina, endotelina, endotelina 1, eotaxina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), péptido activador de neutrófilos epiteliales 78 (ENA-78), eritropoyetina (Epo), estriol, exodus, factor IX, factor VIII, proteína de unión a ácidos grasos, ferritina, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos 11, factor de crecimiento de fibroblastos 12, factor de crecimiento de fibroblastos 13, factor de crecimiento de fibroblastos 14, factor de crecimiento de fibroblastos 15, factor de crecimiento de fibroblastos 16, factor de crecimiento de fibroblastos 17, factor de crecimiento de fibroblastos 18, factor de crecimiento de fibroblastos 19, factor de crecimiento de fibroblastos 2, factor de crecimiento de fibroblastos 20, factor de crecimiento de fibroblastos 3, factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de crecimiento de fibroblastos 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8, factor de crecimiento de fibroblastos 9, fibronectina, cinasa de adhesión focal (FAK), folitropina α , galactosa-oxidasa, β -galactosidasa, γ -IP-10, gastrina, GCP, G-CSF, factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), proteína gliofibrilar ácida, proteína de filamentos gliales (GFP), receptor de la familia de factores neurotróficos derivados de células gliales (GFR), globulina, glucosa-oxidasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, glutamato-descarboxilasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, glicerol-deshidrogenasa, glicerol-cinasa, isoenzima BB de la glucógeno-fosforilasa, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), proteína estimuladora del crecimiento (GRO), hormona del crecimiento, hormona de liberación de la hormona del crecimiento, hemopexina, factor eritropoyético hepático (hepatopoyetina), herregulina α , herregulina β 1, herregulina β 2, herregulina β 3, hexocinasa, histona, proteína morfogenética ósea humana, relaxina humana H2, hialuronidasa, hidroxisteroide-deshidrogenasa, factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), I-309/ITCA-3, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IgA, IgE, IgG, IgM, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II), interferón, factor quimiotáctico α de células T inducible por interferón (I-TAC), interleucina, interleucina 12 β , proteína de unión a interleucina 18, factor trébol intestinal, IP10, Jagged 1, Jagged 2, cadena ligera κ , factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), Kiss1, La/SS-B, lactato-deshidrogenasa, L-lactato deshidrogenasa, lactoferrina, lactoperoxidasa, cadena ligera λ , laminina α 1, laminina α 2, laminina β 1, laminina β 2, laminina β 3, laminina γ 1, laminina γ 2, LD78 β , leptina, leucina-aminopeptidasa, hormona luteinizante (LH), LIF, lipasa, factor de crecimiento de células hepáticas, quimiocina expresada en el hígado (LEC), antígeno LKM, TNF, TNF- β , luciferasa, hormona de liberación de la hormona luteinizante, proteína del gen activador de linfocitos 1 (LAG-1), linfotactina, lisozima, proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α), quimiocina derivada de macrófagos (MDC), malato-deshidrogenasa, maltasa, MCP (proteína quimiotáctica de macrófagos/monocitos)-1, 2, 3 y 4, M-CSF, MEC (CCL28), proteína de membrana relacionada con el receptor frizzled (Mfrp), midquina, MIF, MIG (monocina inducida por interferón γ), MIP-2 a 5, MIP-1 β , Mp40, factor de crecimiento de mastocitos y células T P40, proteína básica de mielina, mieloperoxidasa, mioglobina, miostatina, factor de diferenciación del crecimiento 8 (GDF-8), miosina, miosina LC, miosina HC, ATPasa, NADasa, NAP-2, factor de crecimiento negativo, factor de crecimiento

neural (NGF), neuraminidasa, neurregulina 1, neurregulina 2, neurregulina 3, enolasa específica de neuronas, neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4), neurturina, NGF, NGF- β , nicastrina, nitrato-reductasa, óxido-nítrico-sintetasas, nortestosterona, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NP-1, NT-1 a 4, NT-3 Tpo, NT-4, nucleasa, oncostatina M, ornitina-transcarbamoilasa, osteoprotegerina, ovoalbúmina, oxalato-descarboxilasa, P16, papaína, 5 PBP, PBSF, PDGF, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PEDF, pepsina, péptido YY (PYY), peroxidasa, persefina, PF-4, P-glucoproteína, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, fosfodiesterasa I, fosfodiesterasa II, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, fosfoglucomutasa, fosfolipasa, fosfolipasa A2, fosfolipasa C, fosfotirosina-cinasa, polipéptido activador de la adenilato-ciclasa de la pituitaria, lactógeno placentario, placoglobina, placofilina, aminooxidasa plasmática, proteína plasmática de unión a retinol, plasminógeno, pleiotropina (PTN), PLGF-1, PLGF-2, toxina antivírica de 10 fitolaca, prealbúmina, proteína plasmática asociada al embarazo A, glucoproteína β 1 específica del embarazo (SP1), prodinorfina, proencefalina, progesterona, proinsulina, prolactina, precursor de la hormona concentradora de melanina (Pmch), proopiomelanocortina, proorfina, antígeno específico de la próstata (PSA), fosfatasa ácida prostática (PAP), protrombina, PSA-A1, proteína surfactante pulmonar A, piruvato-cinasa, ranpirnasa, RANTES, reelina, renina, resistina, globulina de unión a retinol (RBP), RO/SS-A 60 kDa, RO/SS-A 52 kDa, S100 (cerebro humano) (BB/AB), S100 (humana) homodímero BB, saposina, SCF, SCGF- α , SCGF- β , SDF-1 α , SDF-1 β , proteína 15 secretada relacionada con el receptor frizzled 1 (Sfrp1), proteína secretada relacionada con el receptor frizzled 2 (Sfrp2), proteína secretada relacionada con el receptor frizzled 3 (Sfrp3), proteína secretada relacionada con el receptor frizzled 4 (Sfrp4), proteína secretada relacionada con el receptor frizzled 5 (Sfrp5), secretina, factor tímico del suero, globulina de unión (SHBG), somatomedina, somatostatina, somatotropina, s-RankL, sustancia P, 20 superóxido-dismutasa, TGF- α , TGF- β , tiorredoxina, trombopoyetina (TPO), trombospondina 1, trombospondina 2, trombospondina 3, trombospondina 4, trombospondina 5, trombospondina 6, trombospondina 7, factor tímico humoral, timopoyetina, timosina α 1, timosina α 1, quimiocina regulada por activación y el timo (TARC), quimiocina expresada por el timo (TECK), tiroglobulina (Tg), antígeno microsomal tiroideo, peroxidasa tiroidea, peroxidasa tiroidea (TPO), tiroxina (T4), globulina de unión a tiroxina (TBG), TNF- α , receptor de TNF, transferrina, receptor de 25 transferrina, factor de crecimiento transformante de la familia b, transtirretina, triacilglicerol-lipasa, triyodotironina (T3), tropomiosina α , cinasa relacionada con la tropomiosina (trk), troponina C, troponina I, troponina T, tripsina, inhibidores de tripsina, tripsinógeno, TSH, Tweak, tirosina-descarboxilasa, ubiquitina, UDP-glucuronil-transferasa, ureasa, uricasa, proteína de la orina 1, urocortina 1, urocortina 2, urocortina 3, urotensina II, proteína similar a Vang 1 (Vangl1), proteína similar a Vang 2 (Vangl2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), precursor del 30 péptido intestinal vasoactivo, vimentina, proteína de unión a la vitamina D, factor de von Willebrand, Wnt1, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt12, Wnt13, Wnt14, Wnt15, Wnt16, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9, xantina-oxidasa, proteína de unión a fosfolípidos de células claras, clostripaína, clusterina, CNTF, colágeno, colagenasa, colágenos (tipo I-VI), factor estimulante de colonias, complemento C1q, complemento C3, complemento C3a, complemento C3b- α , complemento C3b- β , complemento C4, complemento C5, 35 factor del complemento B, concanavalina A, corticoliberina, hormona liberadora de corticotropina, proteína C reactiva (CRP), péptido natriurético de tipo C (Cnp), cistatina C, dímero D, δ 1, cinasa similar a δ 1 (DIK1), desoxirribonucleasa, desoxirribonucleasa I, desoxirribonucleasa II, ácidos desoxirribonucleicos, dersalazina, dextranasa, diaforasa, ADN-ligasa de T4, ADN-polimerasa 1, ADN-polimerasa de T4, EGF, elastasa, elastina, factor de crecimiento endotelial vascular derivado de glándulas endocrinas (EG-VEGF), elastina, endotelina, endotelina 1, eotaxina, factor de 40 crecimiento epidérmico (EGF), péptido activador de neutrófilos epiteliales 78 (ENA-78), eritropoyetina (Epo), estriol, Exodus, factor IX, factor VIII, proteína de unión a ácidos grasos, ferritina, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos 11, factor de crecimiento de fibroblastos 12, factor de crecimiento de fibroblastos 13, factor de crecimiento de fibroblastos 14, factor de crecimiento de fibroblastos 15, factor de crecimiento de fibroblastos 16, factor de crecimiento de fibroblastos 17, factor de 45 crecimiento de fibroblastos 18, factor de crecimiento de fibroblastos 19, factor de crecimiento de fibroblastos 2, factor de crecimiento de fibroblastos 20, factor de crecimiento de fibroblastos 3, factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de crecimiento de fibroblastos 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8, factor de crecimiento de fibroblastos 9, fibronectina, cinasa de adhesión focal (FAK), folitropina α , galactosa-oxidasa, β -galactosidasa, γ -IP-10, gastrina, GCP, G-CSF, factor neurotrófico 50 derivado de células gliales (GDNF), proteína gliofibrilar ácida, proteína de filamentos gliales (GFP), receptor de la familia de factores neurotróficos derivados de células gliales (GFR), globulina, glucosa-oxidasa, glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, β -glucuronidasa, glutamato-descarboxilasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, glicerol-deshidrogenasa, glicerol-cinasa, isoenzima BB de la glucógeno-fosforilasa, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), proteína estimuladora del crecimiento (GRO), 55 hormona del crecimiento, hormona de liberación de la hormona del crecimiento, hemopexina, factor eritropoyético hepático (hepatopoyetina), herregulina α , herregulina β 1, herregulina β 2, herregulina β 3, hexocinasa, histona, proteína morfogenética ósea humana, relaxina humana H2, hialuronidasa, hidroxiesteroide-deshidrogenasa, factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), I-309/ITCA-3, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IgA, IgE, IgM, insulina, factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I), factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II), interferón, factor 60 quimiotáctico α de células T inducible por interferón (I-TAC), interleucina, interleucina 12 β , proteína de unión a interleucina 18, factor trébol intestinal, IP10, Jagged 1, Jagged 2, cadena ligera κ , factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), Kiss1, La/SS-B, lactato-deshidrogenasa, L-lactato deshidrogenasa, lactoferrina,

lactoperoxidasa, cadena ligera λ , laminina $\alpha 1$, laminina $\alpha 2$, laminina $\beta 1$, laminina $\beta 2$, laminina $\beta 3$, laminina $\gamma 1$, laminina $\gamma 2$, LD78 β , leptina, leucina-aminopeptidasa, hormona luteinizante (LH), LIF, lipasa, factor de crecimiento de células hepáticas, quimiocina expresada en el hígado (LEC), antígeno LKM, TNF, TNF- β , luciferasa, hormona de liberación de la hormona luteinizante, proteína del gen activador de linfocitos 1 (LAG-1), linfotactina, lisozima, 5 proteína inflamatoria de macrófagos 1α (MIP-1 α), quimiocina derivada de macrófagos (MDC), malato-deshidrogenasa, maltasa, MCP (proteína quimiotáctica de macrófagos/monocitos)-1, 2, 3 y 4, M-CSF, MEC (CCL28), proteína de membrana relacionada con el receptor frizzled (Mfrp), midquina, MIF, MIG (monocina inducida por interferón γ), MIP-2 a 5, MIP-1 β , Mp40, factor de crecimiento de mastocitos y células T P40, proteína básica de mielina, mieloperoxidasa, mioglobina, miostatina, factor de diferenciación del crecimiento 8 (GDF-8), miosina, 10 miosina LC, miosina HC, ATPasa, NADasa, NAP-2, factor de crecimiento negativo, factor de crecimiento neural (NGF), neuraminidasa, neurregulina 1, neurregulina 2, neurregulina 3, enolasa específica de neuronas, neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4), neurturina, NGF, NGF- β , nicastrina, nitrato-reductasa, óxido-nítrico-sintetasas, nortestosterona, Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, NP-1, NT-1 a 4, NT-3 Tpo, NT-4, nucleasa, oncostatina M, ornitina-transcarbamoylase, osteoprotegerina, ovoalbúmina, oxalato-d Descarboxilasa, P16, papaína, PBP, PPSF, 15 PDGF, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PEPDF, pepsina, péptido YY (PYY), peroxidasa, persefina, PF-4, P-glucoproteína, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, fosfodiesterasa I, fosfodiesterasa II, fosfoenolpiruvato-carboxilasa, fosfoglucomutasa, fosfolipasa, fosfolipasa A2, fosfolipasa C, fosfotirosina-cinasa, polipéptido activador de la adenilato-ciclasa de la pituitaria, lactógeno placentario, placoglobina, placofilina, aminooxidasa plasmática, proteína plasmática de unión a retinol, plasminógeno, pleiotropina (PTN), PLGF-1, PLGF-2, toxina antivírica de fitolaca, 20 prealbúmina, proteína plasmática asociada al embarazo A, glucoproteína $\beta 1$ específica del embarazo (SP1), prodinorfina, proencefalina, progesterona, proinsulina, prolactina, precursor de la hormona concentradora de melanina (Pmch), proopiomelanocortina, proorfina, antígeno específico de la próstata (PSA), fosfatasa ácida prostática (PAP), protrombina, PSA-A1, proteína surfactante pulmonar A, piruvato-cinasa, ranpirnasa, RANTES, reelina, renina, resistina, globulina de unión a retinol (RBP), RO/SS-A 60 kDa, RO/SS-A 52 kDa, S100 (cerebro humano) (BB/AB), S100 (humana) homodímero BB, saposina, SCF, SCGF- α , SCGF- β , SDF-1 α , SDF-1 β , proteína secretada relacionada con el receptor frizzled 1 (Sfrp1), proteína secretada relacionada con el receptor frizzled 2 (Sfrp2), proteína secretada relacionada con el receptor frizzled 3 (Sfrp3), proteína secretada relacionada con el receptor frizzled 4 (Sfrp4), proteína secretada relacionada con el receptor frizzled 5 (Sfrp5), secretina, factor tímico del suero, globulina de unión (SHBG), somatomedina, somatostatina, somatotropina, s-RankL, sustancia P, 30 superóxido-dismutasa, TGF- α , TGF- β , tioredoxina, trombospondina (TPO), trombospondina 1, trombospondina 2, trombospondina 3, trombospondina 4, trombospondina 5, trombospondina 6, trombospondina 7, factor tímico humoral, timopoyetina, timosina $\alpha 1$, timosina $\alpha 1$, quimiocina regulada por activación y el timo (TARC), quimiocina expresada por el timo (TECK), tiroglobulina (Tg), antígeno microsomal tiroideo, peroxidasa tiroidea, peroxidasa tiroidea (TPO), tiroxina (T4), globulina de unión a tiroxina (TBG), TNF- α , receptor de TNF, transferrina, receptor de 35 transferrina, factor de crecimiento transformante de la familia b, transtirretina, triacilglicerol-lipasa, triyodotironina (T3), tropomiosina α , cinasa relacionada con la tropomiosina (trk), troponina C, troponina I, troponina T, tripsina, inhibidores de tripsina, tripsinógeno, TSH, Tweak, tirosina-d Descarboxilasa, ubiquitina, UDP-glucuronil-transferasa, ureasa, uricasa, proteína de la orina 1, urocortina 1, urocortina 2, urocortina 3, urotensina II, proteína similar a Vang 1 (Vangl1), proteína similar a Vang 2 (Vangl2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), precursor del 40 péptido intestinal vasoactivo, vimentina, proteína de unión a la vitamina D, factor de von Willebrand, Wnt1, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt12, Wnt13, Wnt14, Wnt15, Wnt16, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9 y xantina-oxidasa.

[0157] Después del proceso de modificación genética, la muestra de tejido puede analizarse con el fin de verificar la expresión del gen de interés por dicha muestra de tejido. Esto puede realizarse por cualquier 45 procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, mediante ELISA para la detección de proteínas o mediante un ensayo de transferencia (Northern blot) para el ARN. La eficacia de un sistema vector de expresión en particular y del procedimiento de introducción del ácido nucleico en una célula puede evaluarse mediante estrategias estándar usadas rutinariamente en la técnica. Por ejemplo, el ADN introducido en una célula puede detectarse por una técnica de hibridación de filtros (por ejemplo, transferencia de Southern) y el ARN producido por transcripción del ADN 50 introducido puede detectarse, por ejemplo por transferencia Northern, protección de ARNasa o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). El producto génico puede detectarse mediante un ensayo adecuado, por ejemplo, por detección inmunológica de la proteína producida, por ejemplo, con un anticuerpo específico o mediante un ensayo funcional para detectar la actividad funcional del producto génico, por ejemplo, un ensayo enzimático. Si el producto génico de interés que ha de expresarse en la célula no puede detectarse 55 fácilmente, es posible optimizar primeramente el sistema de expresión mediante un gen indicador ligado a los elementos de regulación y al vector que va a usarse. El gen indicador codifica un producto génico fácilmente detectable y, por lo tanto, puede usarse para evaluar la eficacia del sistema. Los genes indicadores estándar usados en la técnica incluyen genes que codifican β -galactosidasa, cloranfenicol-acetiltransferasa, luciferasa, GFP/EGFP y la hormona del crecimiento humana.

60 **[0158]** También se contempla el uso del DTMO modificado genéticamente para su trasplante en un organismo. Según se usan en este documento, los términos "administrar", "introducir", "implantar" y "trasplantar"

pueden usarse de manera intercambiable y se refieren a la colocación del DTMO en un sujeto, por ejemplo, un sujeto autólogo, alogénico o xenogénico, mediante un procedimiento o vía que resulte en la localización del DTMO en el sitio deseado. El DTMO se implanta en la situación deseada en el sujeto de tal manera que una porción de las células del DTMO permanezcan viables. En una realización de esta invención, al menos aproximadamente el 5%, en otra realización de esta invención, al menos aproximadamente el 10%, en otra realización de esta invención, al menos aproximadamente el 20%, en otra realización de esta invención, al menos aproximadamente el 30%, en otra realización de esta invención, al menos aproximadamente el 40%, en otra realización de esta invención al menos aproximadamente el 50% o más de las células permanecen viables después de la administración a un sujeto. El periodo de viabilidad de las células después de la administración a un sujeto puede ser desde tan breve como unas pocas horas, por ejemplo de 24 horas a algunos días, hasta tan prolongado como de unas pocas semanas a meses o años. Para facilitar el trasplante de las poblaciones de células dentro de un tejido que puede estar sometido a un ataque inmunológico por parte del hospedador, por ejemplo si se usan injertos xenogénicos, como en los trasplantes entre cerdo y humano, el DTMO puede insertarse o bien encapsularse en un material inmunoprotector biocompatible, como dispositivos recargables biodegradables o no biodegradables y luego trasplantarse al sujeto receptor. Los productos génicos producidos por tales células/tejido pueden administrarse, por ejemplo, por medio de dispositivos poliméricos diseñados para la liberación controlada de compuestos, por ejemplo, fármacos, incluidas sustancias biofarmacéuticas proteínicas. Para formar un implante para la liberación sostenida de un producto génico de las poblaciones de células de la invención en un sitio diana en particular pueden usarse diversos polímeros compatibles (por ejemplo, hidrogeles), incluidos polímeros tanto biodegradables como no degradables. La generación de tales implantes es generalmente conocida en la técnica. Por ejemplo, véase Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials, ed. David Williams (MIT Press: Cambridge, MA, EE. UU., 1990); la patente de los EE. UU. n° 4.883.666 de Sabel y col.; la patente de los EE. UU. n° 4.892.538 de Aebischer y col.; la patente de los EE. UU. n° 5.106.627 de Aebischer y col.; la patente de los EE. UU. n° 4.391.909 de Lim; y la patente de los EE. UU. n° 4.353.888 de Sefton. Las poblaciones de células dentro del DTMO pueden administrarse en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, como disolución salina estéril y disoluciones tampón acuosas. El uso de tales vehículos y diluyentes es bien conocido en la técnica.

[0159] La proteína secretada, por ejemplo, sin limitación, puede ser cualquier proteína de acuerdo con las realizaciones de la invención descritas anteriormente. En una realización de esta invención, la proteína de interés puede ser eritropoyetina. En otra realización, el procedimiento puede usarse para la expresión y la secreción de cualquier proteína conocida en la técnica y de combinaciones de estas. Además, el procedimiento de la invención puede usarse para la expresión de moléculas de ARN (codificantes o no codificantes).

[0160] Alternativamente, el DMO que incluye células modificadas genéticamente puede mantenerse *in vitro* y el agente terapéutico que permanece en el medio sobrenadante que rodea la muestra de tejido puede aislarse e inyectarse o administrarse al mismo sujeto o a un sujeto diferente.

[0161] Alternativa o adicionalmente, un microorganismo dérmico que incluye una célula modificada genéticamente puede conservarse criogénicamente mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, sin limitación, congelación gradual (0°C, -20°C, -80°C, -196°C) en DMEM con DMSO al 10%, inmediatamente después de su formación a partir de la muestra de tejido o después de su alteración genética.

[0162] Las cantidades de muestras de tejido con células modificadas genéticamente que han de implantarse se determinan a partir de uno o más de los factores siguientes: las cantidades correspondientes del agente terapéutico de interés administradas rutinariamente a tales sujetos sobre la base de las directrices reguladoras, protocolos clínicos específicos o estadística poblacional para sujetos similares. Las cantidades correspondientes del agente terapéutico, como la proteína de interés, específicamente para este mismo sujeto, en caso de que este lo haya recibido anteriormente por medio de inyecciones o por otras vías. Los datos del sujeto como peso, edad, condición física, estado clínico. Los datos farmacocinéticos de muestras de tejido anteriores que incluyen la administración de células modificadas genéticamente a otros sujetos similares. La respuesta a muestras de tejido anteriores que incluyen la administración de células modificadas genéticamente a este sujeto.

[0163] De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones, solo algunos de los DTMO se usan en una determinada sesión de tratamiento. Los DTMO restantes pueden retornarse para su mantenimiento (o almacenarse criogénicamente o de otro modo) para un uso posterior.

[0164] Por lo tanto, de acuerdo con una realización se proporciona un procedimiento para determinar la cantidad de un microorganismo dérmico terapéutico que ha de implantarse en un paciente, en que el procedimiento incluye la determinación del nivel de secreción de un agente terapéutico por una cantidad del DTMO *in vitro*; la estimación de una relación entre los niveles de producción y de secreción *in vitro* y los niveles del agente terapéutico en el suero *in vivo*; y la determinación de la cantidad de DTMO que ha de implantarse sobre la base del nivel de secreción determinado y de la relación estimada. Opcionalmente, la relación se estima sobre la base de uno o más factores seleccionados entre el siguiente grupo de factores:

- a) datos del sujeto como peso, edad, condición física, estado clínico;
- b) datos farmacocinéticos de la administración anterior de un DTMO a otros sujetos similares; y
- c) datos farmacocinéticos de la administración anterior de un DTMO a este sujeto.

[0165] Opcionalmente, la relación se estima sobre la base de al menos dos de dichos factores.
 5 Opcionalmente, la relación se basa en tres de dichos factores.

[0166] En una realización, la cantidad de un DTMO que ha de implantarse en un paciente se basa también en uno o los dos factores siguientes:

las cantidades correspondientes de la misma proteína terapéutica administrada rutinariamente a tales sujetos sobre la base de las directrices reguladoras, protocolos clínicos específicos o estadística poblacional para sujetos
 10 similares; y

las cantidades correspondientes del mismo agente terapéutico específicas para este mismo sujeto, en caso de que dicho sujeto lo haya recibido anteriormente por medio de inyecciones o por otras vías de administración.

[0167] El procedimiento incluye la preparación de una cantidad del DTMO para su implantación de acuerdo con la cantidad determinada.

15 **[0168]** También se proporciona un procedimiento para ajustar la dosis de un agente terapéutico producido por un DTMO implantado en un sujeto y que excreta un agente terapéutico que incluye (a) la monitorización del nivel del agente terapéutico en el sujeto; (b) la comparación del nivel del agente con un nivel deseado; (c) si el nivel es inferior a un nivel mínimo, la implantación de un DTMO adicional; (d) si el nivel es superior a un nivel máximo, la inactivación o la extracción de una parte del DTMO implantado. Opcionalmente, el procedimiento implica la repetición periódica
 20 de (a)-(d). Alternativa o adicionalmente, la inactivación o la extracción consiste en la extracción de una porción del DTMO implantado. Opcionalmente, la extracción incluye la extirpación quirúrgica. Alternativa o adicionalmente, la inactivación o extracción incluye la inactivación. Opcionalmente, la inactivación incluye la destrucción de una porción del DTMO implantado. Opcionalmente, la inactivación incluye la ablación de una porción del DTMO implantado.

25 **[0169]** Según se describe anteriormente con referencia a la figura 1, al menos parte del proceso de sostenimiento del DMO durante la alteración genética, así como la alteración genética misma pueden llevarse a cabo en un biorreactor, según se describe a continuación.

[0170] El biorreactor puede tener algunas o todas las propiedades siguientes:

a) Permitir el suministro de nutrientes y gases a las superficies del DMO, de modo que estos puedan difundirse en el DMO y el DMO pueda permanecer viable. Por lo tanto, no pueden bloquearse áreas ni volúmenes significativos del
 30 DMO impidiendo su puesta en contacto con un líquido circundante.

b) Permitir el mantenimiento del DMO a una temperatura deseada.

c) Permitir el mantenimiento de un pH y una composición gaseosa deseados en la proximidad del DMO.

d) Permitir la extracción de productos de desecho del DMO y/o del biorreactor.

e) Permitir un procedimiento sencillo de inserción del vector de modificación genética sin riesgo sustancial de que el
 35 vector de inserción contamine el entorno.

f) Permitir la extracción del exceso de vector no usado.

g) Permitir la medición de la cantidad de agente terapéutico generado.

h) Permitir la extracción del agente terapéutico sustancialmente estéril.

i) Permitir la fácil inserción del DMO y la extracción de todo o de cantidades medidas de DTMO.

40 **[0171]** A continuación se hace referencia a la figura 22, que ilustra esquemáticamente un sistema 2207 para el procesamiento de un DMO recogido 2204.

[0172] El sistema 2207 puede incluir un biorreactor 2200 con una o más cámaras de procesamiento 2202, cada una adaptada para acomodar un DMO 2204. El biorreactor 2200, que en una realización ejemplar tiene un número de cámaras igual al número de los DMO recogidos de un sujeto en particular, puede adaptarse para
 45 suministrar un líquido o líquidos adecuados, por ejemplo, un medio de cultivo, a una o más cámaras de

procesamiento 2202 desde un depósito de líquido local 2208 y/o descargar el líquido de una o más de las cámaras de procesamiento 2202, por ejemplo, a un contenedor de residuos 2210, según se describe más adelante. El líquido puede suministrarse al depósito 2208 a través de una línea de entrada 2242, por ejemplo, conectada al depósito 2208 a través de un conector estéril 2258, según se describe más adelante.

5 **[0173]** El DMO 2204 puede transferirse a la cámara 2202 mediante la herramienta de corte usada para la recogida del DMO 2204, por ejemplo, según se describe anteriormente. Preferentemente, la transferencia del DMO a la cámara 2202 puede realizarse directamente después de la recogida del DMO 2204 y mientras se mantienen las condiciones estériles. La cámara de procesamiento 2202 puede incluir un puerto de inserción del DMO 2201, adaptado para recibir al DMO 2204. Por ejemplo, el puerto 2201 puede incluir un septo estéril de separación capaz
10 de recibir una cánula roma, por ejemplo, un sitio de inyección SafeLine®, comercializado por B. Braun Medical Inc. Una vez que la punta de la herramienta de corte se ha insertado a través del septo, el DMO 2204 puede expulsarse suavemente a la cámara 2202 de manera generalmente estéril, por ejemplo, mediante una jeringa conectada al extremo posterior de la herramienta de corte. De acuerdo con una realización ejemplar de la invención, el DMO 2204 puede expulsarse a un baño de medio 2206 dentro de la cámara 2202. Alternativamente, si, por ejemplo, el DMO se
15 ha recogido con una guía interior, por ejemplo, descrita anteriormente, es posible retirar una tapa 2232 colocada sobre la cámara 2202, por ejemplo, según se describe más adelante, extraer cuidadosamente el DMO 2204 de la guía interior y colocarlo dentro de la cámara 2202 y volver a colocar y sellar la tapa 2232 sobre la cámara 2202 para mantener la esterilidad de la cámara 2202.

[0174] El biorreactor 2200 puede adaptarse para aplicar, por ejemplo, de manera generalmente idéntica, uno
20 o más procesos a los DMO que se acomodan dentro de al menos alguna de las cámaras de procesamiento. El biorreactor 2200 puede adaptarse para separar fluidicamente los contenidos de una o más de las cámaras de procesamiento de los contenidos de una o más de las otras cámaras de procesamiento, según se describe más adelante.

[0175] El biorreactor 2200 puede incluir también un mecanismo para controlar el flujo de un líquido hacia
25 dentro y/o fuera de la cámara de procesamiento 2202, según se describe más adelante.

[0176] De acuerdo con una realización ejemplar, el biorreactor 2200 puede incluir un regulador estéril 2222 conectado fluidicamente con una bomba de jeringa no estéril 2214, que puede adaptarse para inyectar aire en el regulador 2222 y/o descargar aire del regulador 2222 de manera estéril, por ejemplo, a través de un filtro estéril 2220, por ejemplo, un filtro de aire de 0,45 µm de poro. El biorreactor 2200 puede incluir también una válvula de
30 control 2212 capaz de moverse entre al menos cuatro posiciones, por ejemplo, una posición de entrada al regulador en la que el depósito de entrada 2208 se conecta fluidicamente con el regulador 2222, una posición de salida del regulador, en la que en contenedor de residuos 2210 se conecta fluidicamente con el regulador 2222, una posición de regulador a cámara, en la que la cámara 2202 se conecta fluidicamente con el regulador 2222 y/o una posición de no conexión, en la que el regulador 2222, la cámara 2202, el depósito de entrada 2208 y el contenedor de
35 residuos 2210 están desconectados fluidicamente entre sí. Un pistón 2226 puede conectar la válvula 2212 con un motor 2224 adaptado para mover la válvula 2212 entre las diferentes posiciones. Opcionalmente, sobre el pistón 2226 puede colocarse un diafragma de fuelle 2228, de modo que sustancialmente no haya transferencia de aire no estéril al regulador estéril 2222, por ejemplo, durante el movimiento del pistón 2226.

[0177] El sistema 2201 puede incluir también un motor 2216 para accionar el émbolo 2218 de la bomba de
40 jeringa 2214. Si el biorreactor 2200 incluye más de una cámara, puede implementarse un solo motor para el accionamiento simultáneo de cada uno de los émbolos asociados con las cámaras o pueden implementarse varios motores, cada uno de los cuales es capaz de accionar uno o más de los émbolos.

[0178] El sistema 2201 puede incluir un controlador 2286 capaz de controlar la operación del motor 2216 y/o el motor 2224, por ejemplo, según se describe más adelante.

45 **[0179]** El líquido del depósito 2208 puede transferirse de manera controlable a la cámara 2202, por ejemplo, con el fin de llenar la cámara 2202. Por ejemplo, el controlador 2286 puede activar el motor 2224 para colocar la válvula 2212 en la posición de entrada al regulador y activar de manera controlable el motor 2216 de modo que la bomba de jeringa 2214 evacue una cantidad predeterminada de aire del regulador 2222. Como resultado, es posible
50 "aspirar" del depósito de entrada 2208 al regulador 2222 un volumen predeterminado de líquido que corresponde a dicho volumen predeterminado de aire. Después, el controlador 2286 puede activar de manera controlable el motor 2224 para mover la válvula 2212 a la posición de regulador a cámara y activar de manera controlable el motor 2216, de modo que la bomba de jeringa 2214 descargue el líquido del regulador 2222 a la cámara 2202. De manera similar, la bomba de jeringa y la válvula de control pueden controlarse para descargar el contenido de la cámara 2202 o una cantidad parcial de este en el contenedor de residuos 2210.

55 **[0180]** El líquido en la cámara 2202 puede agitarse y/o mezclarse de manera controlada, por ejemplo, con el fin de facilitar la transducción vírica y/o cualquier otro procedimiento de mantenimiento *ex vivo* aplicado al DMO

2204. Por ejemplo, el controlador 2286 puede activar de manera controlable el motor 2216 y/o el motor 2224, por ejemplo, según se describe anteriormente, para descargar periódicamente el líquido o una parte de este de la cámara 2202 al regulador y a continuación inyectar el líquido del regulador 2222 de vuelta a la cámara 2202.

5 **[0181]** Puede usarse aire para purgar el líquido situado en una o más de las "líneas de paso", por ejemplo, que conectan fluidicamente el depósito de entrada 2208, el contenedor de residuos 2210 y/o la cámara 2202, con el fin de "lavar" dichas líneas de paso después de transferir líquido a/desde la cámara 2202, el depósito de entrada 2208 y/o el regulador 2222. Este aspecto puede ser útil, por ejemplo, con el fin de reducir el "volumen muerto" de líquido que puede quedar "atrapado" en una o más de las líneas de paso. Por ejemplo, el controlador 2286 puede activar de manera controlable el motor 2216 para mover el émbolo de la jeringa 2218 de modo que se aspire un
10 volumen de aire predeterminado en el regulador 2222 antes de aspirar el líquido del depósito 2208 en el regulador 2222. El regulador 2222 puede tener una geometría tal que el aire se eleve por encima del líquido dentro del regulador 2222, de modo que al accionar la bomba de jeringa 2214 puede descargarse primero el líquido en el regulador 2222, seguido del aire, el cual actuará para lavar las líneas de paso de algo o de todo el líquido que quede en estas.

15 **[0182]** La superficie del fondo 2230 de la cámara 2202 puede incluir varios orificios o un patrón similar a una malla, por ejemplo, configurados para permitir la transferencia del líquido dentro y/o fuera de la cámara 2202 de una manera sustancialmente uniforme y/o para permitir la descarga de sustancialmente la mayor parte del líquido de la cámara 2202. Esta configuración puede permitir también reducir la ocurrencia de "puntos muertos", es decir, áreas de la cámara 2202 en las que el líquido permanece estancado y/o no se renueva.

20 **[0183]** La tapa 2232 puede ser una tapa estéril retirable, como una membrana fijada por un adhesivo despegable, un tapón de silicona o similar. La tapa 2232 puede adaptarse para mantener una "barrera" estéril entre la cámara 2202 y el entorno. Opcionalmente puede implementarse un filtro de aire estéril 2234, por ejemplo, un filtro de aire de 0,45 µm de poro, para conectar fluidicamente la cámara 2202 con el entorno, permitiendo así equilibrar la presión mientras se mantiene una barrera estéril entre la cámara 2202 y el entorno. Alternativamente, la tapa 2232
25 puede incluir un material "transpirable", de modo que la presión pueda equilibrarse a través de dicha tapa 2232.

[0184] El depósito 2208 y/o el contenedor de residuos 2210 pueden conectarse normalmente, por ejemplo, por medio de uno o más colectores (no se muestran), con una o más cámaras de procesamiento 2202 para un sujeto específico. Alternativamente, el depósito de entrada 2208 y/o el contenedor de residuos 2210 pueden conectarse individualmente con cada una de las cámaras de procesamiento. El depósito de entrada 2208 y/o el
30 contenedor de residuos 2210 pueden incluir un mecanismo para equilibrar la presión de manera estéril. Por ejemplo, el depósito de entrada 2208 y/o el contenedor de residuos 2210 pueden conectarse fluidicamente con el entorno a través de un filtro de aire estéril 2236 y/o un filtro de aire estéril 2238, respectivamente. El filtro 2236 y/o el filtro 2238 pueden incluir, por ejemplo, un filtro de aire de 0,45 µm de poro. Alternativamente, el contenedor de residuos 2210 puede incluir un contenedor de residuos expansible, de modo que no se necesita equilibrar la presión y, por lo tanto,
35 no se necesita el uso de un filtro estéril para ello.

[0185] El biorreactor 2200 puede adaptarse para permitir la inyección de líquido o la descarga de líquido directas de/a la cámara 2202. Puede usarse un puerto de muestreo con septo 2240, por ejemplo, para la inyección directa de un líquido con un vector vírico o para el muestreo del medio de cultivo para analizar diversos parámetros del biorreactor, como ELISA, absorción de glucosa, producción de lactato o cualquier otro parámetro indicativo. El
40 puerto con septo 2240 puede incluir un puerto de silicona estándar adaptado para la inserción de una aguja o un puerto para cánulas, por ejemplo, según se describe anteriormente con referencia al puerto de inserción del DMO 2201. A través del puerto con septo 2240, puede insertarse una jeringa (no se muestra) de manera extraíble. La jeringa puede accionarse mediante un motor, por ejemplo, similar al motor 2216, que puede activarse manual o automáticamente, por ejemplo, mediante un controlador 2286.

45 **[0186]** Al menos algunos y en algunas realizaciones ejemplares todos los componentes del biorreactor 2200 pueden mantenerse en condiciones predeterminadas, por ejemplo, condiciones de incubación que incluyen una temperatura de aproximadamente 37°C, una atmósfera gaseosa de aproximadamente el 90-95% de aire y aproximadamente el 5-10% de CO₂ y/o un relativamente alto grado de humedad, por ejemplo, del 85-100%. De acuerdo con una realización ejemplar, solo la cámara 2202 puede mantenerse en las condiciones de incubación.
50 Según se describe anteriormente, estas condiciones de incubación pueden necesitarse, por ejemplo, para mantener la vitalidad del cultivo de tejidos del DMO.

[0187] Puede implementarse una disposición de suministro de líquido para suministrar líquido a la línea de entrada 2242 desde al menos un tanque de líquido, por ejemplo, los tanques de líquido 2244 y 2246. En una realización ejemplar, los tanques 2244 y 2246 pueden contener el mismo líquido, por ejemplo, un medio de cultivo,
55 en cuyo caso un tanque puede usarse como depósito de apoyo para el otro tanque. En otra realización ejemplar, los tanques 2244 y 2246 pueden contener dos tipos de líquidos diferentes, por ejemplo, dos tipos de medio de cultivo

para usar en distintas etapas del procesamiento del DMO. El tanque 2244 y/o el tanque 2246 pueden incluir un filtro de aire estéril para equilibrar la presión de manera estéril, por ejemplo, según se describe anteriormente con referencia al depósito 2208. Alternativamente, el tanque 2244 y/o el tanque 2246 pueden incluir un tanque colapsable, por ejemplo, una bolsa de plástico estéril según se conocen en la técnica.

- 5 **[0188]** Cada uno de los tanques 2244 y 2246 pueden conectarse fluidicamente con un conector de combinación 2254 por medio de una válvula 2252, por ejemplo, una válvula de manguito flexible, un puerto conector con septo 2248 y una púa de penetración 2250. El conector 2254 puede incluir, por ejemplo un conector en Y o en T, según se conocen en la técnica. La válvula 2252 puede adaptarse para controlar el flujo de líquido desde el tanque 2244 y/o el tanque 2246 al conector 2254. Entre el conector 2254 y el conector 2258, a lo largo de la línea de
10 entrada 2242, puede situarse una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica 2256. El controlador 2286 puede usarse para controlar la cantidad y/o la tasa de flujo del líquido suministrado al depósito 2208 mediante el accionamiento controlable del motor 2257 y/o las válvulas 2252.

- [0189]** De acuerdo con una realización ejemplar, el líquido contenido en los tanques 2244 y/o 2246 puede tener una vida útil de almacenamiento de nueve días en condiciones de refrigeración a 4°C. Por lo tanto, puede
15 emplearse un sistema de refrigeración (no se muestra) para mantener el líquido de los tanques 2244 y/o 2246 a una temperatura que puede ser inferior a la temperatura de incubación del depósito 2208. Por consiguiente, la línea de entrada 2242 puede pasar a través de una interfase entre condiciones de refrigeración y condiciones de incubación. Una vez que la vida útil ha expirado, el tanque 2244 y/o el tanque 2246 pueden reemplazarse por nuevos tanques.

- [0190]** Al menos algunos de los elementos del biorreactor 2200 pueden estar formados por componentes
20 desechables de plástico estéril. De acuerdo con estas realizaciones, el aparato biorreactor 2200 puede incluir un aparato biorreactor empaquetado estérilmente de un solo uso que puede transportarse al sitio de recogida de un DMO y puede abrirse en un entorno estéril y prepararse *in situ*, de modo que se inyecta medio de cultivo en cada cámara 2202 del biorreactor. La herramienta usada para la recogida de los DMO puede insertarse a través de los puertos de inserción de DMO 2201 para expulsar los DMO a las cámaras 2202 de manera estéril, según se describe
25 anteriormente. El aparato biorreactor 2200 puede transportarse, por ejemplo, en condiciones de incubación, a un sitio de procesamiento donde puede conectarse con otros componentes del sistema 2207, por ejemplo, el conector 2258, los motores 2216 y/ 2224, las válvulas de manguito flexible 2252 y/o la bomba peristáltica 2256. El controlador 2286 puede controlar entonces el mantenimiento y la transducción del DMO durante la totalidad del proceso *ex vivo* en el que se produce el DTMO a partir del DMO recogido. La dosificación necesaria para el sujeto específico puede determinarse mediante el uso del modelo farmacocinético, por ejemplo, según se describe en este documento. El
30 aparato biorreactor 2200 puede separarse entonces del sistema 2207 y transportarse, por ejemplo, en condiciones de incubación, al sitio de implantación. Con el fin de implantar un DTMO específico, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos de implantación descritos anteriormente, la cámara 2202 del biorreactor para el DTMO específico puede abrirse retirando la tapa 2232 y el DTMO puede extraerse de la cámara.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

Niveles de secreción de eritropoyetina humana *in vitro* por DTMO-hEPO

[0191] Se realizaron experimentos para analizar la variabilidad del nivel de secreción de hEPO *in vitro* entre los DTMO-hEPO obtenidos de diferentes muestras de piel humanas.

40 Procedimiento experimental

[0192] Los DTMO-hEPO se prepararon (por triplicado) a partir de muestras de piel obtenidas de seis sujetos humanos diferentes y los niveles de secreción de hEPO se midieron en determinados momentos, según se indica en la figura 4, después de haber lavado el vector vírico.

Resultados experimentales

- 45 **[0193]** Los niveles de secreción de los DTMO-hEPO fueron similares entre las diferentes muestras de piel humanas. Además, los niveles de secreción de los DTMO-hEPO fueron similares a los niveles de hEPO obtenidos previamente a partir de un TMO-hEPO de piel de espesor parcial (datos no mostrados).

Ejemplo 2

Histología

- 50 **[0194]** Con el fin de verificar que el DTMO contiene fundamentalmente componentes dérmicos, se realizó un análisis histológico. Los MO se prepararon a partir de piel de espesor parcial o de muestras de piel dérmicas y el

análisis histológico fue realizado por un dermatólogo. Según puede observarse en el lado izquierdo de la figura 5, el DTMO contiene capas dérmicas y componentes dérmicos, sin capas basales ni/o epidérmicas residuales. En comparación, el TMO de piel de espesor parcial, que se muestra en el lado derecho de la figura 5, contiene todas las capas de la piel, incluidas las capas basales y epidérmicas.

5 Ejemplo 3

Estudios inmunocitoquímicos

[0195] Para estudiar qué células se transducen en el tejido del DTMO-hEPO, se llevó a cabo un análisis inmunocitoquímico histológico del DTMO-hEPO en el día 9 después de la recogida mediante un anticuerpo monoclonal dirigido contra hEPO (dilución 1:20). El análisis mostró una fuerte tinción de los fibroblastos dérmicos, según se muestra en la figura 6. La tinción se extendió por todo el DTMO.

Ejemplo 4

Comparación de la actividad hematopoyética de hEPO derivada de un DTMO-hEPO y de un TMO entero a largo plazo en ratones SCID

[0196] Se realizó un experimento para examinar y comparar los efectos a largo plazo de un DTMO-hEPO y un TMO-hEPO derivado de piel de espesor parcial, implantados subcutáneamente en ratones SCID.

Procedimiento experimental

[0197] Se prepararon un DTMO-hEPO humano y un TMO-hEPO derivado de piel de espesor parcial humana y se implantaron subcutáneamente en dos grupos de ratones SCID (cinco ratones por grupo). En un grupo de control se implantaron un DTMO y un TMO derivado de piel de espesor parcial humanos transducidos con un vector vírico Ad/lacZ.

Resultados experimentales

[0198] Según se muestra en la figura 7, en los dos grupos experimentales se identificaron niveles de secreción y respuestas fisiológicas similares, mientras que, según lo esperado, los ratones del grupo de control no mostraron hEPO en la sangre.

[0199] En todos los grupos experimentales pudo observarse un aumento del hematocrito, tan pronto como a los 15 días después de la implantación, que se mantuvo durante más de cinco meses, mientras que los ratones de control con MO/lacZ no mostraron tal aumento del nivel de hematocrito. El DTMO-hEPO parece producir niveles de secreción similares durante periodos de tiempo similares en comparación con el TMO-hEPO derivado de piel de espesor parcial.

30 Ejemplo 5

Un DTMO-hEPO no forma quistes de queratina al ser implantado subcutáneamente

Procedimiento experimental

[0200] Un DTMO-hEPO y un TMO-hEPO derivado de piel de espesor parcial se implantaron subcutáneamente en ratones SCID y se supervisó la formación de quistes de queratina mediante análisis clínicos e histológicos.

Resultados experimentales

[0201] Según puede verse claramente en la figura 8, la formación de quistes de queratina pudo observarse en la implantación del TMO-hEPO derivado de piel de espesor parcial a los 76 y 141 después de la implantación. En contraste, no se observó ninguna formación de quistes en los ratones SCID con el DTMO-hEPO a los 113 días después de la implantación.

Ejemplo 6

Integración de un derivado de piel de espesor parcial y un DMO en sujetos humanos sanos

Procedimiento experimental

[0202] Un MO dérmico humano y un TMO derivado de piel de espesor parcial humana se obtuvieron mediante un dermatomo disponible comercialmente (Aesculap GA630). Antes de la recogida se administró anestesia tópica y

local a los sitios donante y receptor mediante la loción Emla (anestesia tópica) e inyecciones subcutáneas de marcaína y adrenalina (anestesia local).

- [0203]** Se recogieron dos tipos de muestras de piel con el fin de producir un MO dérmico humano y un MO derivado de piel de espesor parcial humano. Para el MO derivado de piel de espesor parcial humano se escindió una tira de piel sana de la parte baja del abdomen. A partir de esta sección de piel se prepararon seis MO lineales según se ha descrito anteriormente. Simultáneamente se hicieron cortes de dimensiones específicas en el sitio de implantación mediante una herramienta de corte ajustable y los MO se injertaron poco después en los cortes de la piel. Para preparar los MO dérmicos humanos, la piel se recogió en dos etapas. Primeramente se recogió un colgajo de piel de 200 µm de profundidad, que se mantuvo en gasa húmeda. De este sitio de recogida se recogió una tira de piel de la dermis de 1 mm de profundidad. Después de la recogida de la piel, el colgajo de piel de 200 µm se repuso en el sitio donante, para servir como vendaje biológico. De la tira de la dermis recogida anteriormente se prepararon cuatro MO dérmicos por un procedimiento idéntico al empleado para el TMO derivado de piel de espesor parcial. Los MO dérmicos humanos se implantaron subcutáneamente poco después mediante un trocar. Los sitios donante y receptor se vendaron con una membrana transparente Bioclusive® (Johnson & Johnson, EE. UU.). El vendaje se cambió al cabo de una semana y los implantes se examinaron para comprobar la integración de los injertos. Dos o tres semanas después de la integración de los MO se realizó el procedimiento de abdominoplastia programado y se escindió una sección de la piel que incluía la zona de injerto e implantación. Para determinar la integración de los MO, se llevó a cabo una evaluación clínica en la zona de injerto que incluyó fotografías y un examen histológico.

Resultados experimentales

- [0204]** Una inspección clínica, que se llevó a cabo una semana después de la implantación y el análisis histológico, que se realizó poco después de la abdominoplastia (2-3 semanas después del injerto) mostraron una excelente integración de los MO injertados en los cortes de la piel y en los sitios de implantación subcutánea de los MO dérmicos (figura 9). No se encontró ninguna indicación de inflamación o hinchazón ni en los MO derivados de piel de espesor parcial implantados en los cortes ni en los MO dérmicos implantados subcutáneamente.

25 Ejemplo 7

Implantación autóloga de TMO lineales de piel de espesor parcial de cerdos enanos que expresan la eritropoyetina humana (hEPO) en animales inmunocompetentes

- [0205]** Se prepararon microórganos lineales (30,6 mm de largo y 0,6 µm de ancho) de piel de cerdo enano (Sinclair) a partir de muestras de tejido de piel recientes obtenidas de animales vivos con anestesia general. Las muestras de tejido de piel de espesor parcial de 0,9-1,1 mm (profundidad) se extrajeron mediante un dermatomo comercial (Aesculap GA630) y se limpiaron mediante DMEM con glutamina y penicilina-streptomina en placas de Petri (90 mm).

- [0206]** Con el fin de generar los microórganos lineales, las muestras de tejido anteriores se cortaron mediante un dispositivo de presión con una estructura de cuchilla según se describe anteriormente en las dimensiones deseadas: 30,6 mm x 600 µm. Los microórganos lineales resultantes se colocaron, uno por pocillo, en una microplaca de 24 pocillos con 500 µl por pocillo de DMEM (Biological Industries, Beit Haemek), en ausencia de suero y con el 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas. Cada uno de los pocillos se sometió a un procedimiento de transducción con el fin de generar un microorganismo terapéutico de piel de cerdo enano (TMO de piel de cerdo) mediante un vector adenovirico (1×10^{10} Pl/ml) con el gen de la eritropoyetina humana (Adeno-hEPO) durante 24 horas mientras se agitaba la placa. El medio se cambió cada 2-4 días y se analizó en cuanto a la presencia de hEPO secretada mediante un kit de ELISA específico (n° de catálogo DEP00, Quantikine IVD, R&D Systems).

- [0207]** Los TMO lineales de hEPO de piel de cerdo enano descritos anteriormente se implantaron subcutáneamente y se injertaron como injertos cutáneos en varios cerdos enanos inmunocompetentes (en dos de los cerdos enanos los TMO-hEPO se implantaron subcutáneamente y en otros dos cerdos enanos diferentes los TMO-hEPO se injertaron en cortes de 1 mm de profundidad). Se implantó un número suficiente de TMO-hEPO en cada cerdo enano, de modo que su nivel de secreción combinado antes de la implantación en cada cerdo fue de aproximadamente 7 µg por día. Durante siete días después de la implantación se obtuvieron unos niveles elevados de hEPO en el suero (figura 3A), determinados por un ensayo ELISA, y un aumento del recuento de reticulocitos.

- [0208]** Solamente se ha mostrado un número limitado de cambios genéticos. Sin embargo, sobre la base de la metodología descrita en este documento, en la que un tejido vivo se reimplanta en el cuerpo de un paciente y de la viabilidad de dicho tejido en el cuerpo después de la implantación, está claro que prácticamente cualquier cambio genético en el tejido inducido por prácticamente cualquier procedimiento conocido resultará en la secreción de las proteínas o de otros agentes terapéuticos deseados en el paciente.

- [0209]** A los expertos en la técnica se les ocurrirán variaciones de las realizaciones de la invención, incluidas

combinaciones de las características de las diversas realizaciones. Por lo tanto, el alcance de esta invención se encuentra solamente limitado por el alcance de las reivindicaciones. Además, para evitar cualquier pregunta referente al alcance de las reivindicaciones, donde se usan los términos “comprender”, “incluir” o “tener” y sus formas conjugadas en las reivindicaciones, se indica “incluye, pero sin limitarse necesariamente a estos/as”.

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo dérmico modificado genéticamente que expresa al menos un producto génico recombinante, en que el al menos un producto génico recombinante es un agente terapéutico, en que dicho microorganismo dérmico es un explante de tejido vivo que consta esencialmente de varios componentes dérmicos sin
5 incluir capas epidérmicas, que conservan la microarquitectura y la estructura tridimensional del tejido dérmico del que se derivan, con dimensiones seleccionadas para permitir la difusión pasiva de los nutrientes y gases adecuados a las células de dicho microorganismo dérmico y la difusión de los residuos celulares fuera de dichas células para minimizar la toxicidad y concomitante muerte celular debida a una nutrición insuficiente y a la acumulación de
10 residuos en dicho microorganismo dérmico, en que una dimensión de longitud es de 10-60 mm, en que al menos una dimensión de sección transversal es de 0,5-3,5 mm, en que al menos algunas de dichas células expresan al menos una porción de al menos un producto génico recombinante; y en que dicho explante de microorganismo dérmico puede mantenerse como explante *in vitro* durante varios meses y en que dicho microorganismo dérmico modificado genéticamente se destina al uso en un procedimiento de tratamiento en que el microorganismo dérmico modificado genéticamente se implanta en o bajo la piel de un sujeto receptor y en que el microorganismo dérmico modificado
15 genéticamente produce y secreta dicho al menos un producto génico recombinante.
2. El microorganismo modificado genéticamente de la reivindicación 1, en que dicho microorganismo dérmico incluye al menos parte de la sección transversal de la dermis.
3. El microorganismo dérmico modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en que dicho microorganismo dérmico incluye tejido adiposo.
- 20 4. El microorganismo dérmico modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en que dicho al menos un producto génico recombinante es producido de manera natural por un órgano del que se deriva el microorganismo dérmico.
5. El microorganismo dérmico modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en que dicho al menos un producto génico recombinante no es producido de manera natural por el órgano del que se
25 deriva el microorganismo dérmico.
6. El microorganismo dérmico modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en que dicho microorganismo dérmico incluye una demarcación *in vivo*.
7. El microorganismo dérmico modificado genéticamente para dicho uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en que dicho microorganismo dérmico se deriva de dicho sujeto.
- 30 8. Uso de un microorganismo dérmico modificado genéticamente que expresa al menos un producto génico recombinante, en que el al menos un producto génico recombinante es un agente terapéutico, en que dicho microorganismo dérmico es un explante de tejido vivo que consta esencialmente de varios componentes dérmicos sin incluir capas epidérmicas, que conservan la microarquitectura y la estructura tridimensional del tejido dérmico del que se derivan, con dimensiones seleccionadas para permitir la difusión pasiva de los nutrientes y gases adecuados
35 a las células de dicho microorganismo dérmico y la difusión de los residuos celulares fuera de dichas células para minimizar la toxicidad y concomitante muerte celular debida a una nutrición insuficiente y a la acumulación de residuos en dicho microorganismo dérmico, en que una dimensión de longitud es de 10-60 mm, en que al menos una dimensión de sección transversal es de 0,5-3,5 mm, en que al menos algunas de dichas células expresan al menos una porción de al menos un producto génico recombinante; y en que dicho explante de microorganismo dérmico puede mantenerse como explante *in vitro* durante varios meses, para la determinación *in vitro* del nivel de secreción de
40 dicho al menos un producto génico recombinante.
9. El uso de la reivindicación 8, en que dicho microorganismo dérmico incluye al menos parte de la sección transversal de la dermis.
10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en que dicho microorganismo dérmico incluye tejido
45 adiposo.
11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en que dicho al menos un producto génico recombinante es producido de manera natural por un órgano del que se deriva el microorganismo dérmico.
12. El microorganismo dérmico modificado genéticamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en que dicho al menos un producto génico recombinante no es producido de manera natural por el órgano del que se
50 deriva el microorganismo dérmico.

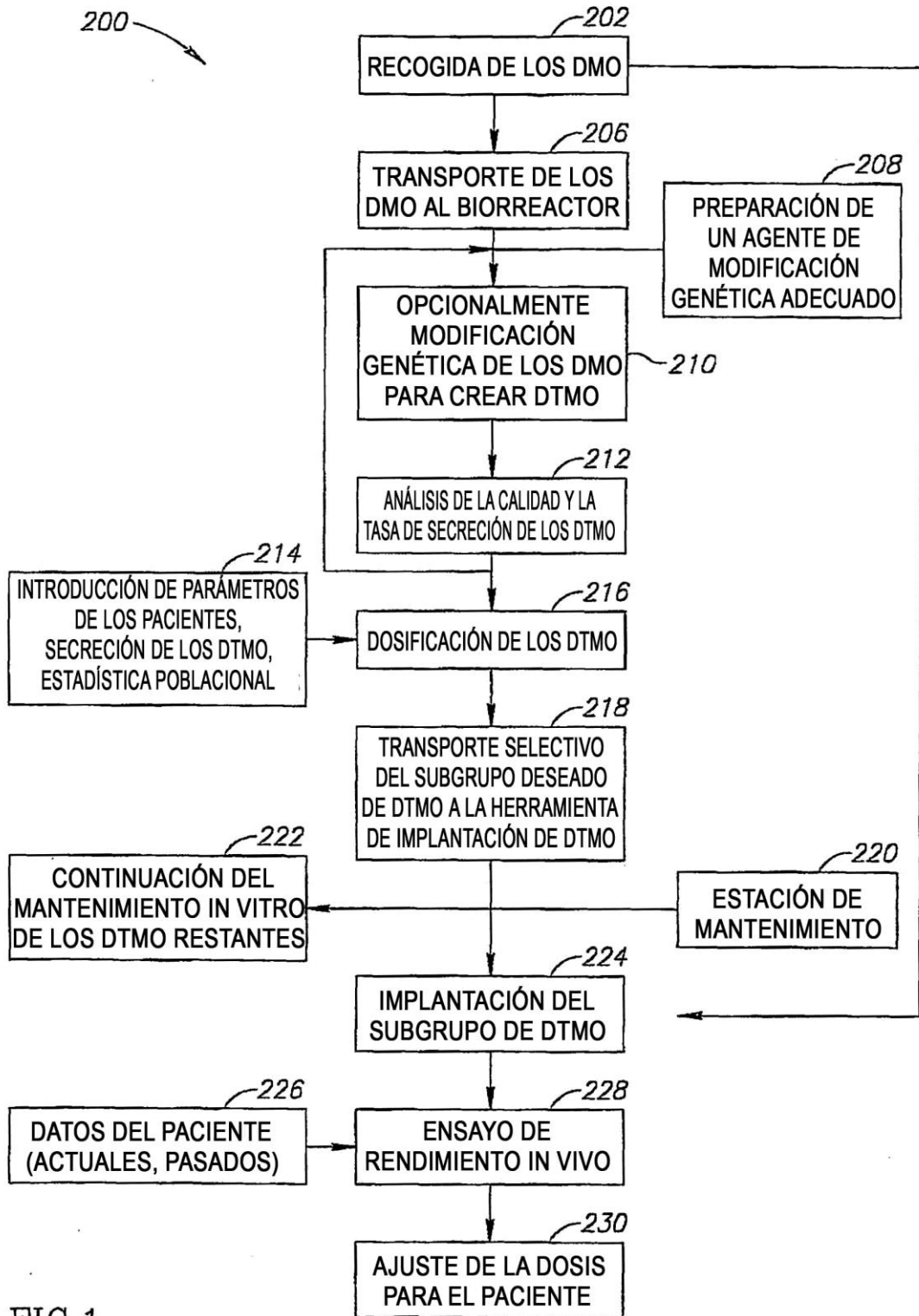


FIG.1

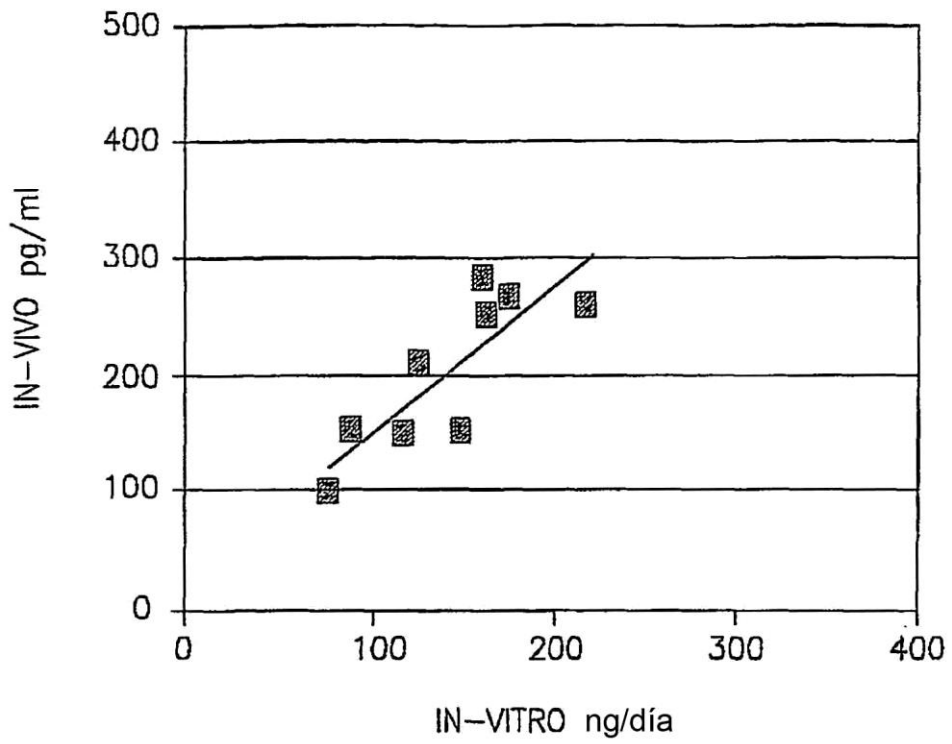


FIG.2A

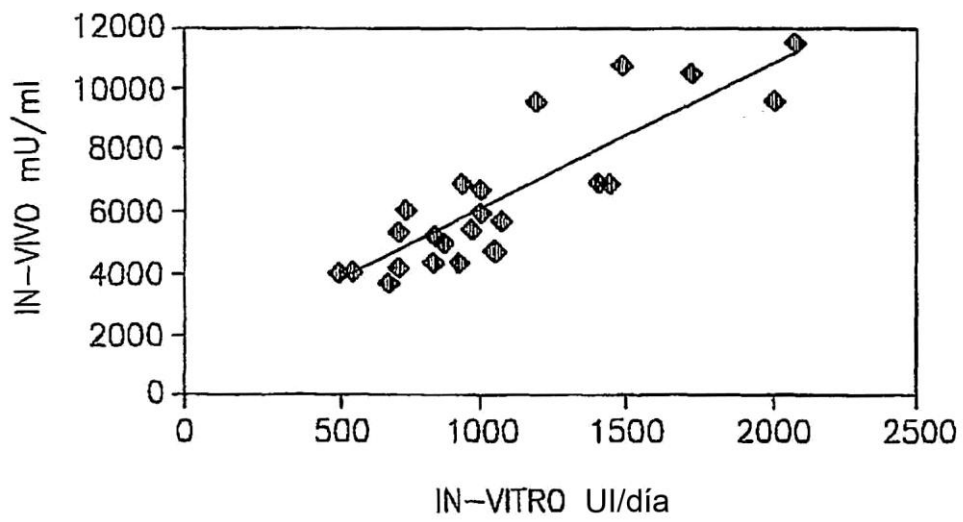


FIG.2B

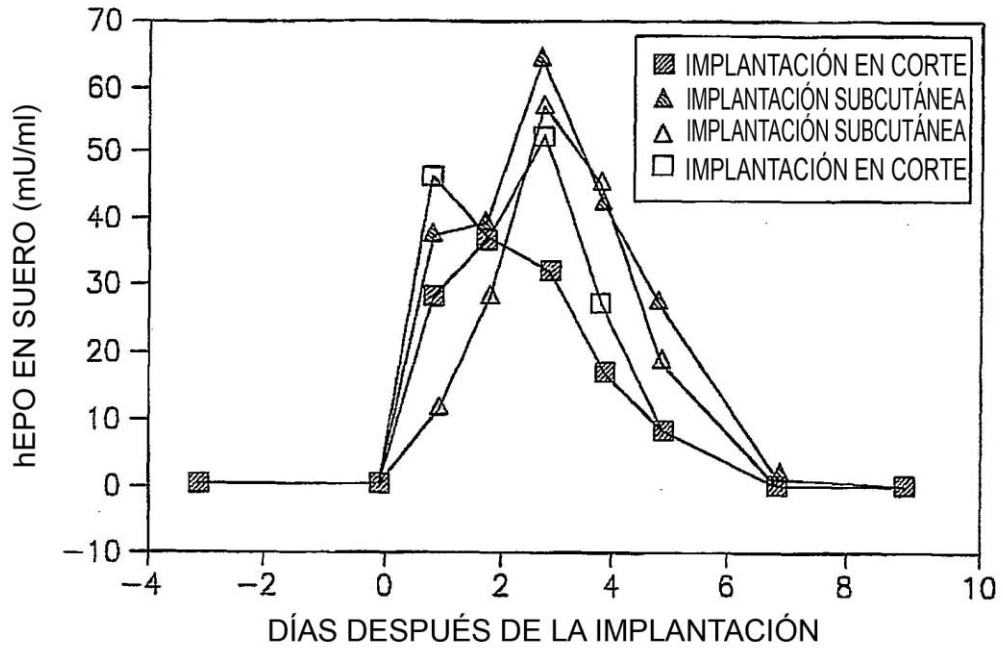


FIG.3A

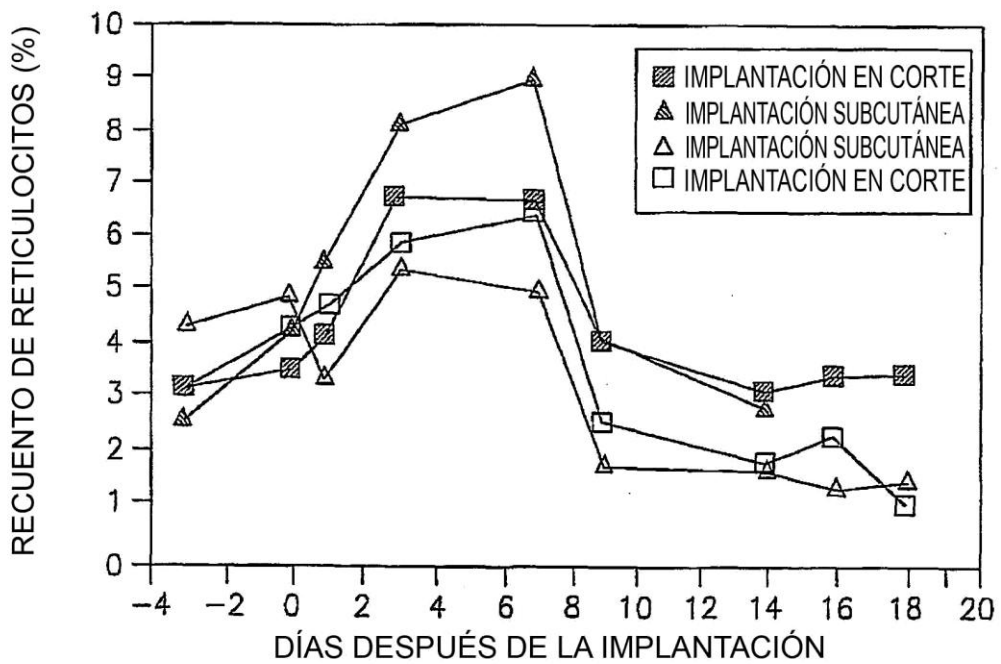


FIG.3B

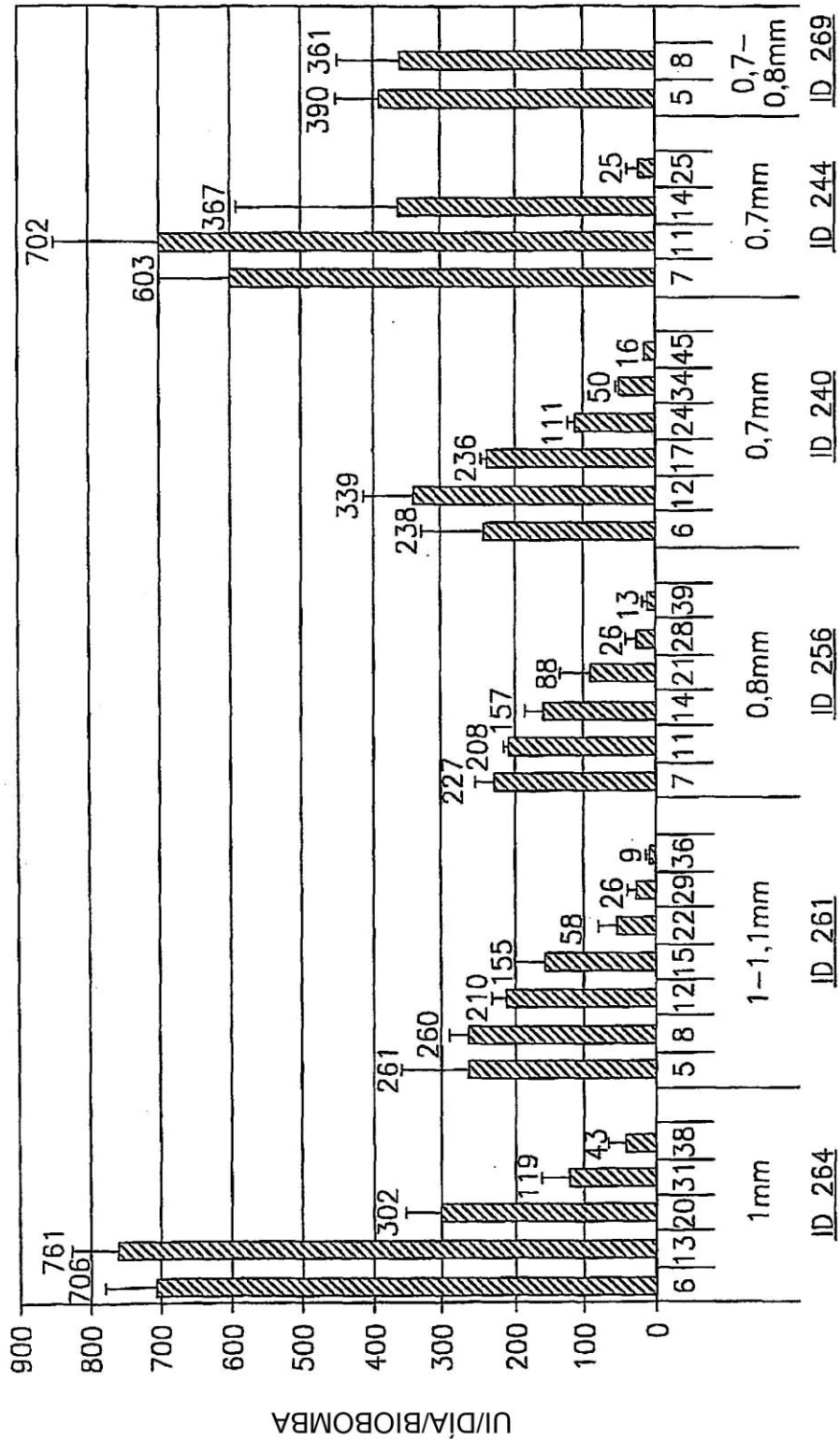


FIG.4

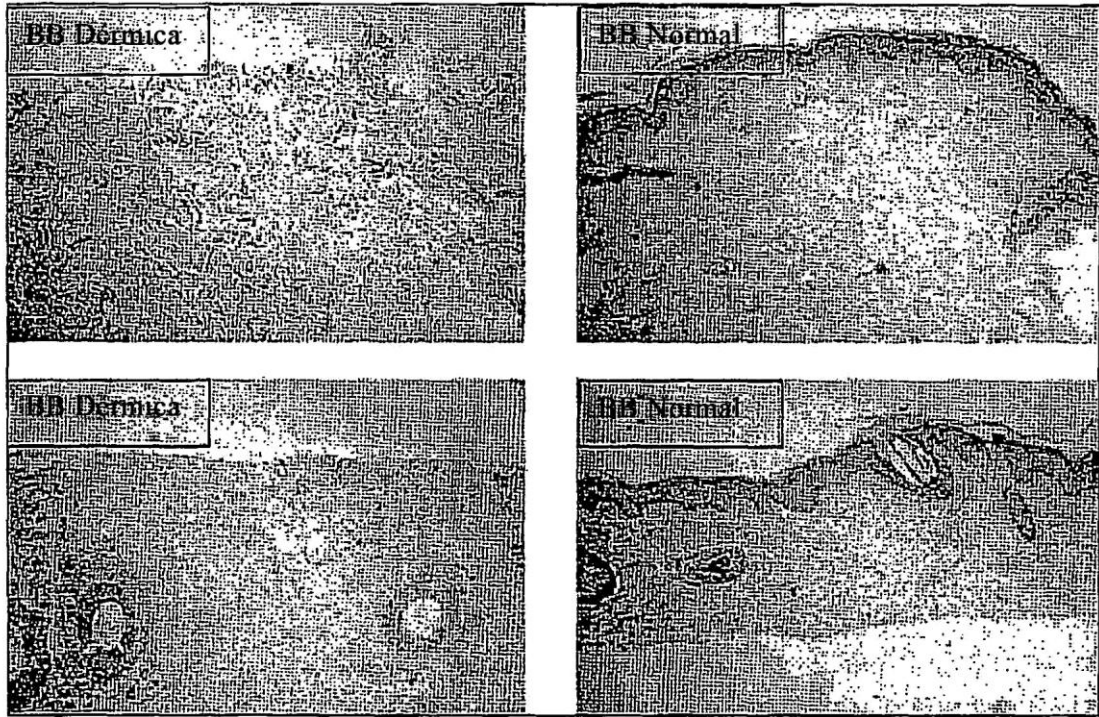


FIG.5

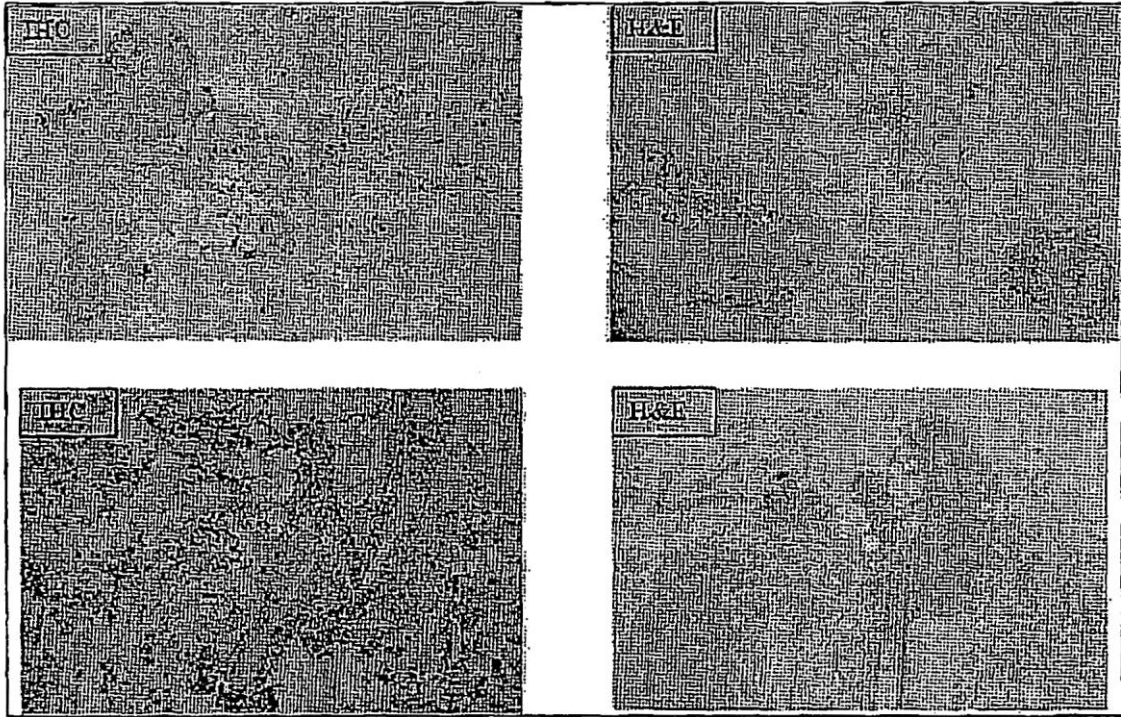
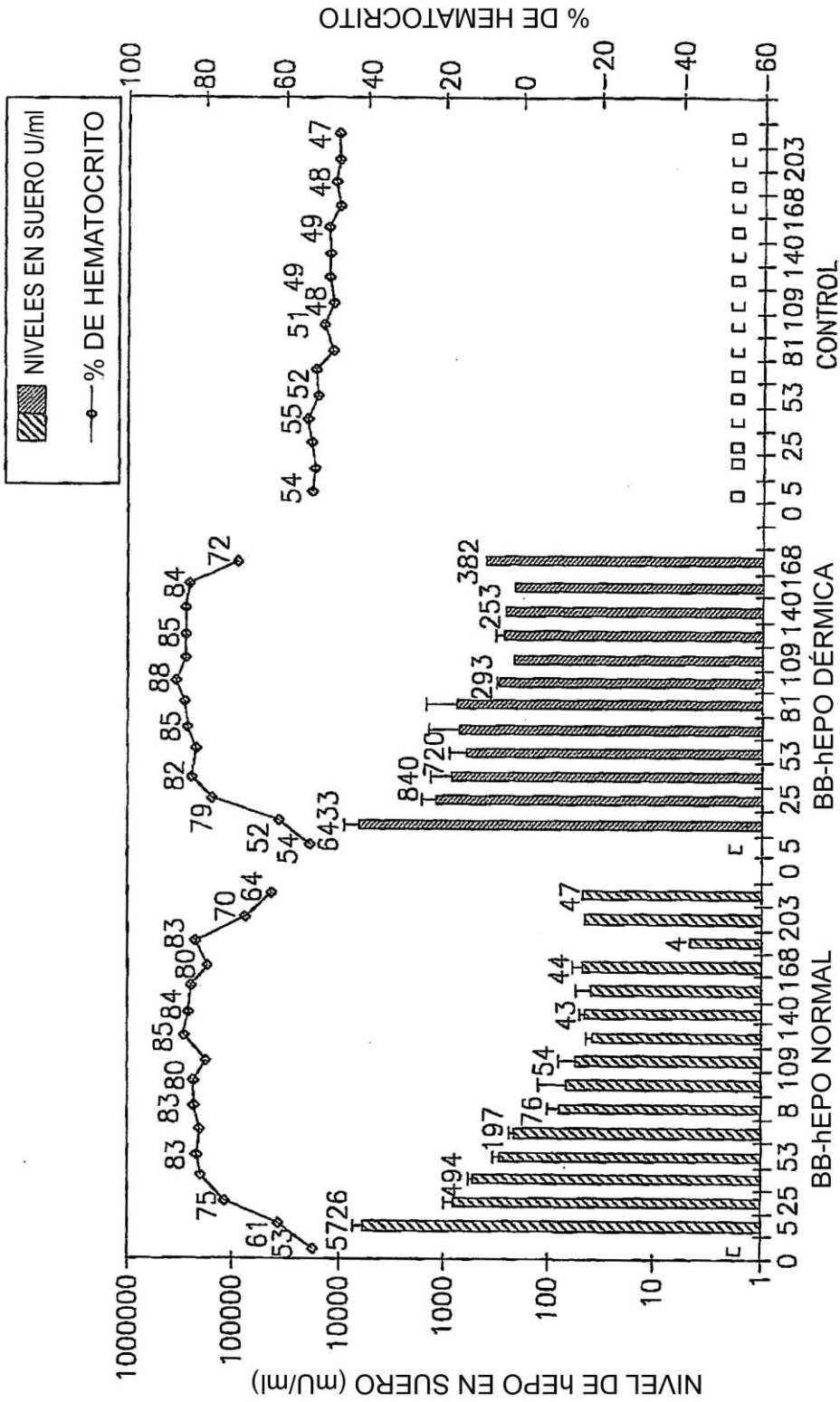


FIG.6



DÍAS DESPUÉS DE LA IMPLANTACIÓN

FIG. 7

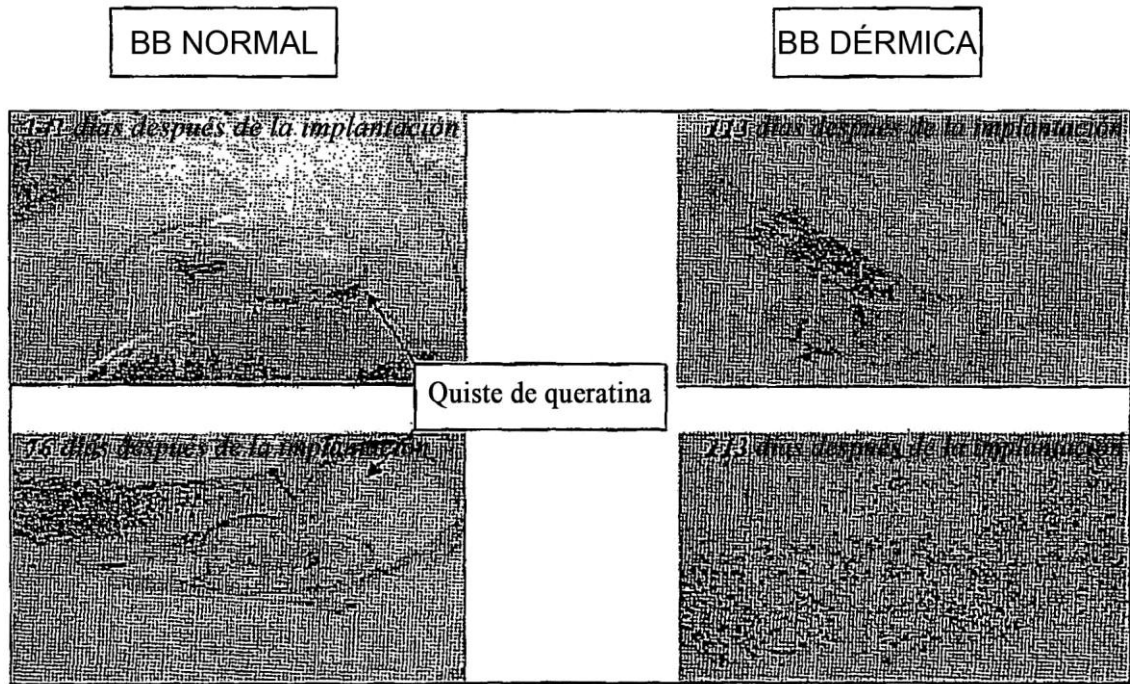


FIG.8

MO DÉRMICOS
IMPLANTADOS
SUBCUTÁNEAMENTE

MO NORMALES
IMPLANTADOS
EN CORTES

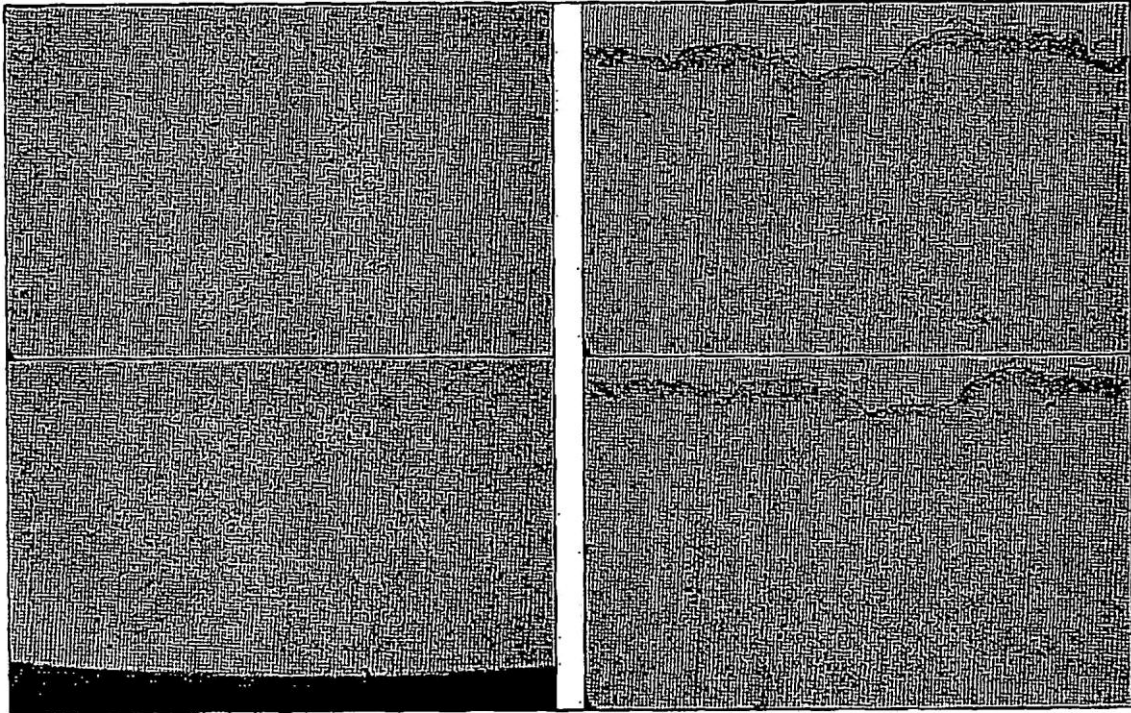


FIG.9

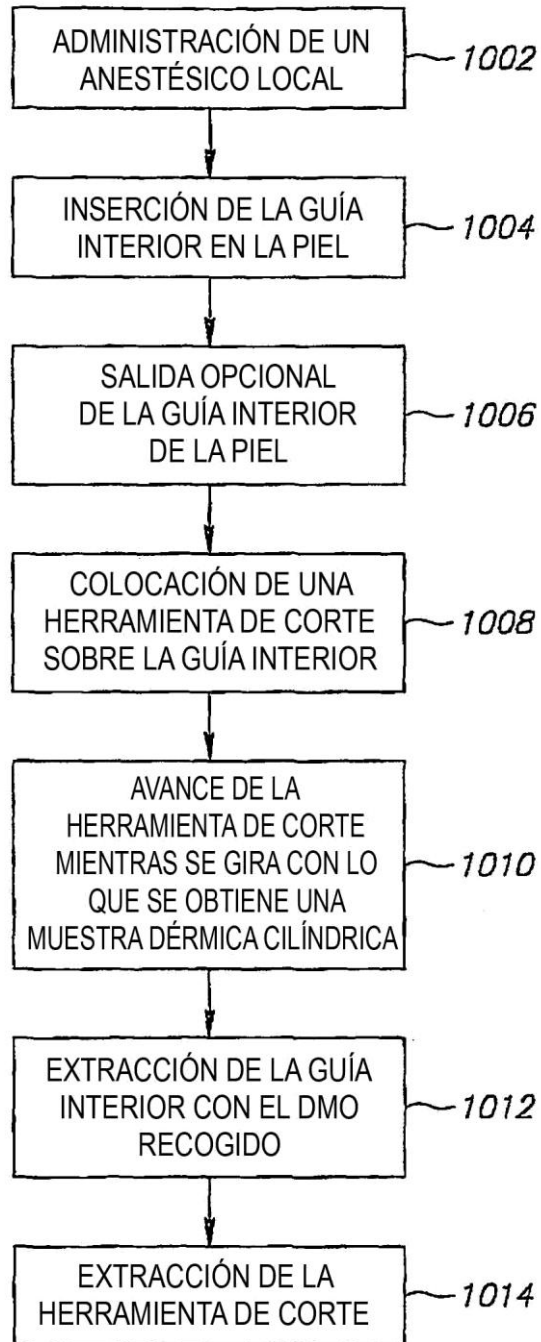


FIG.10

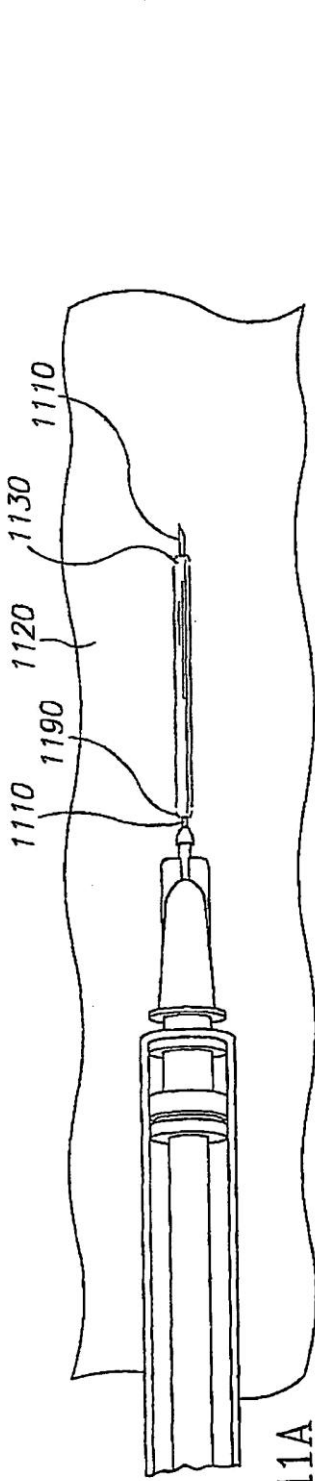


FIG. 11A

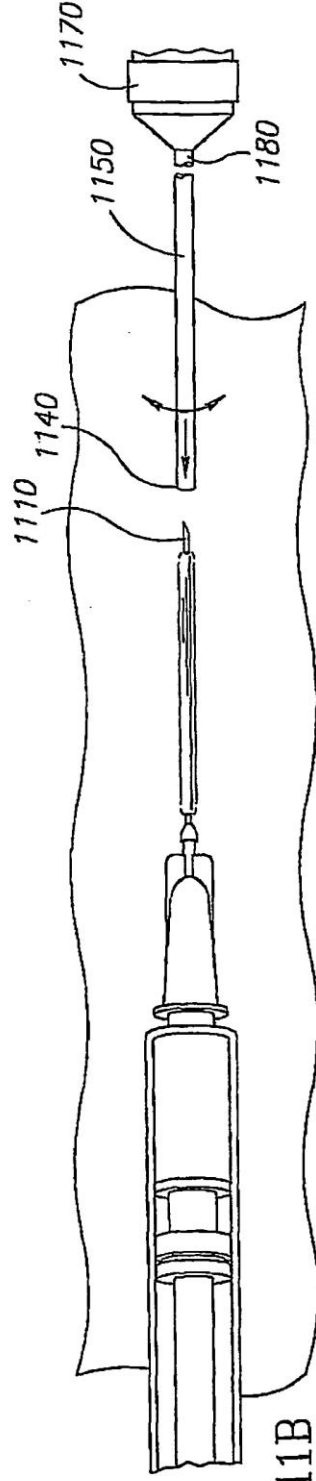


FIG. 11B

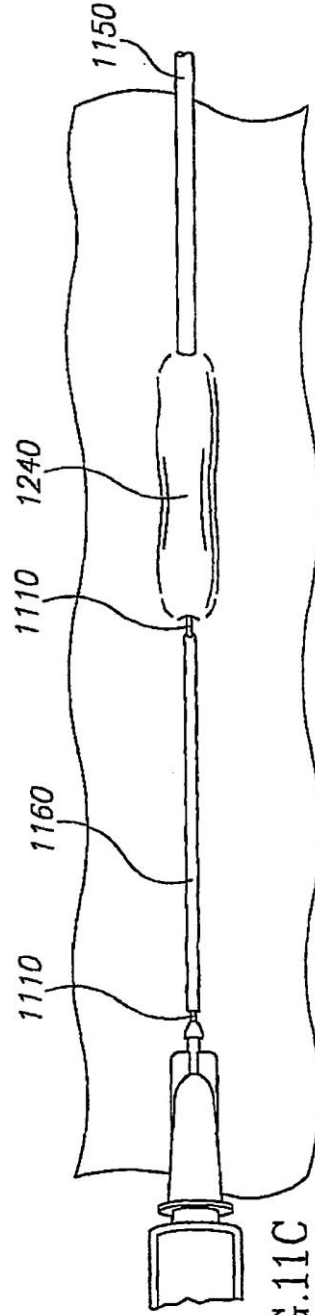


FIG. 11C

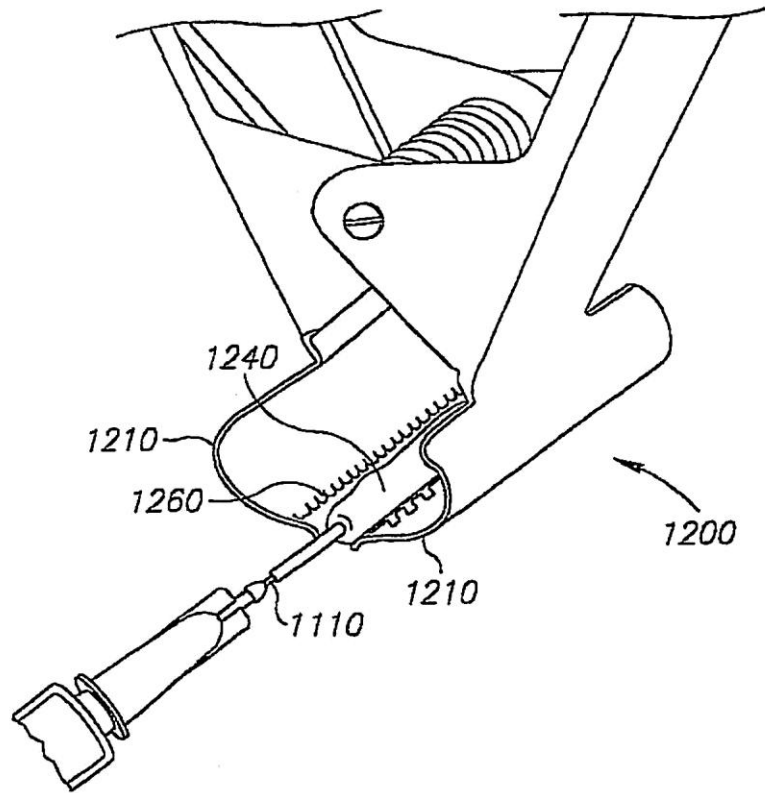


FIG.12

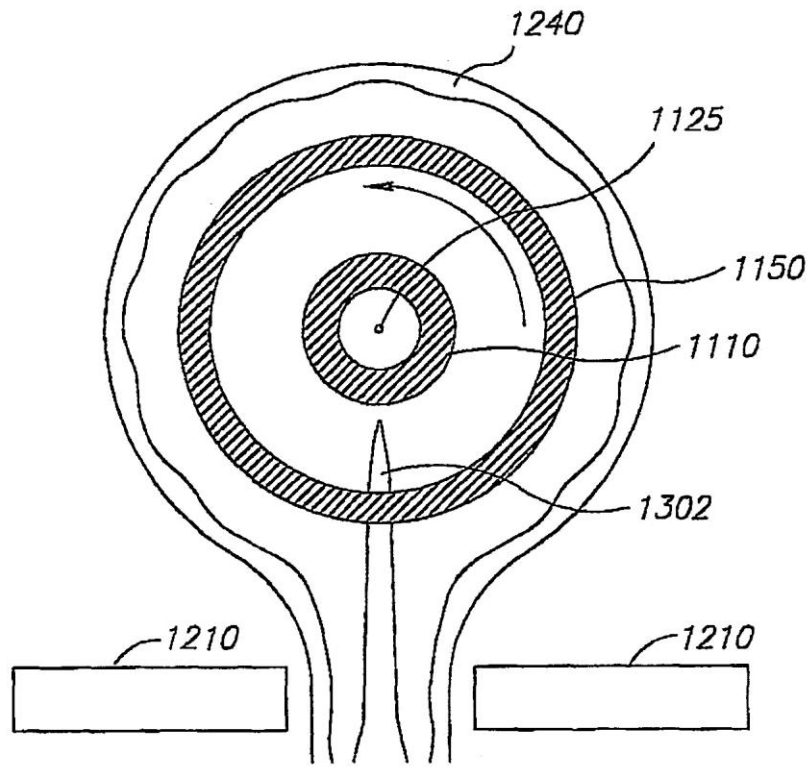
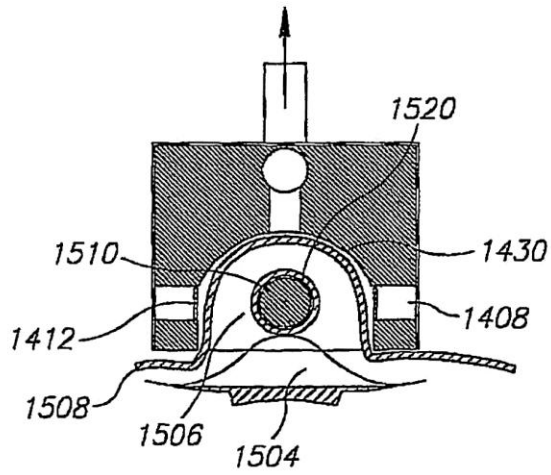
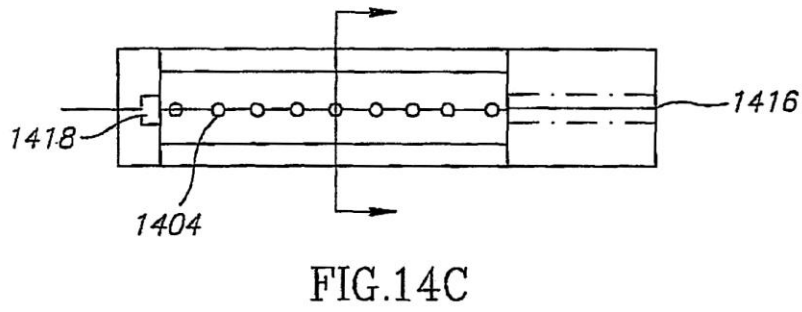
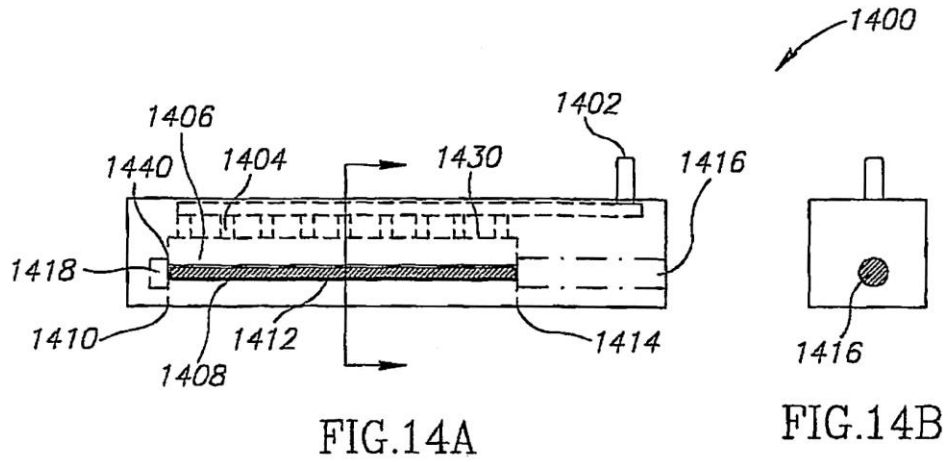


FIG.13



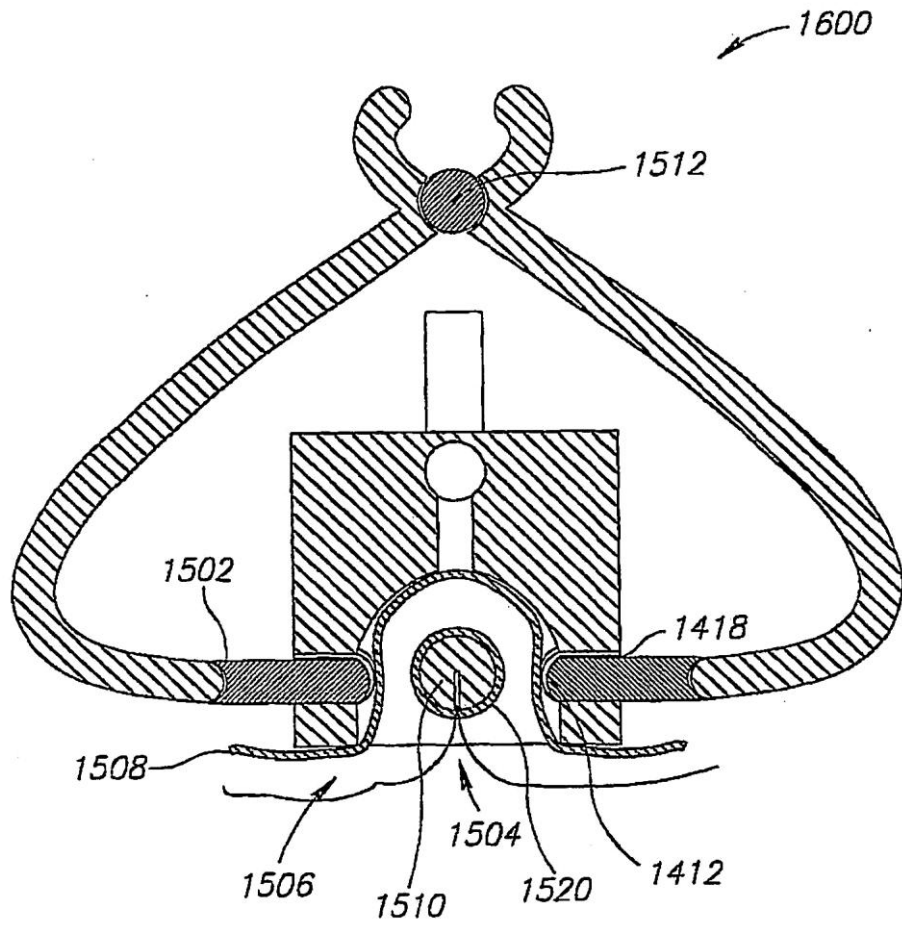


FIG.16

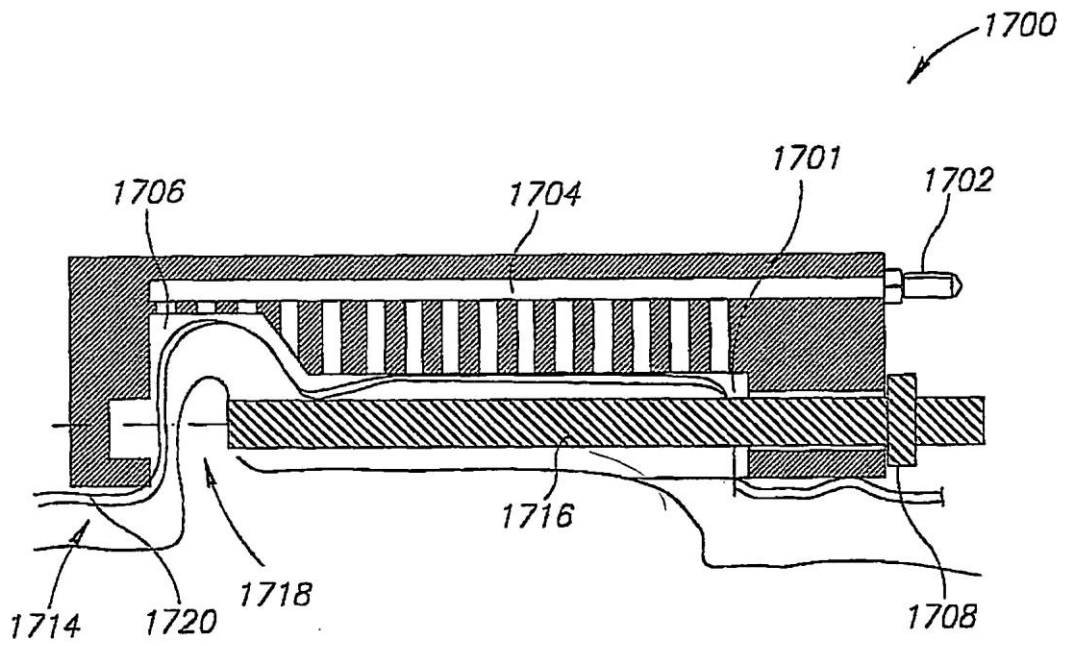


FIG.17

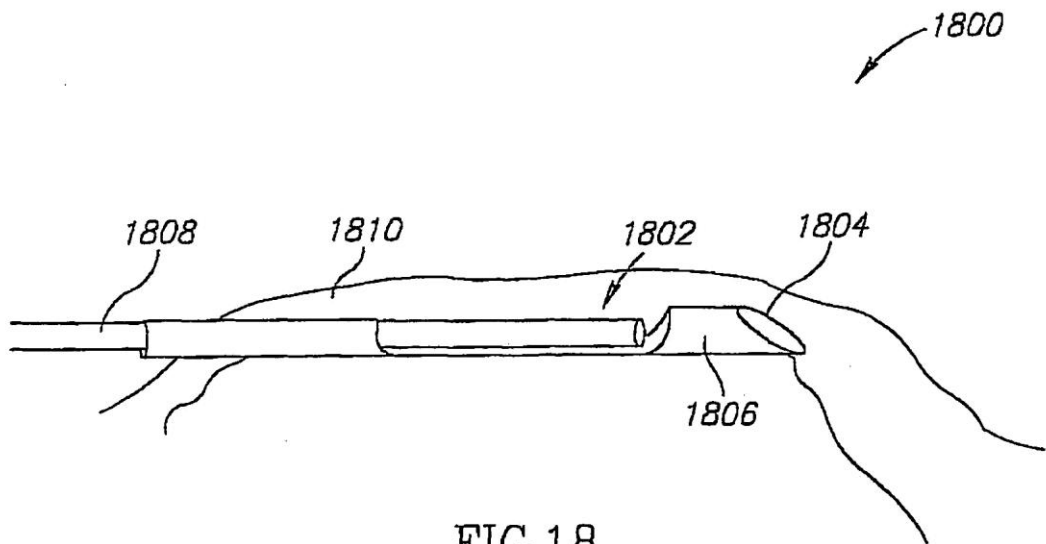


FIG.18

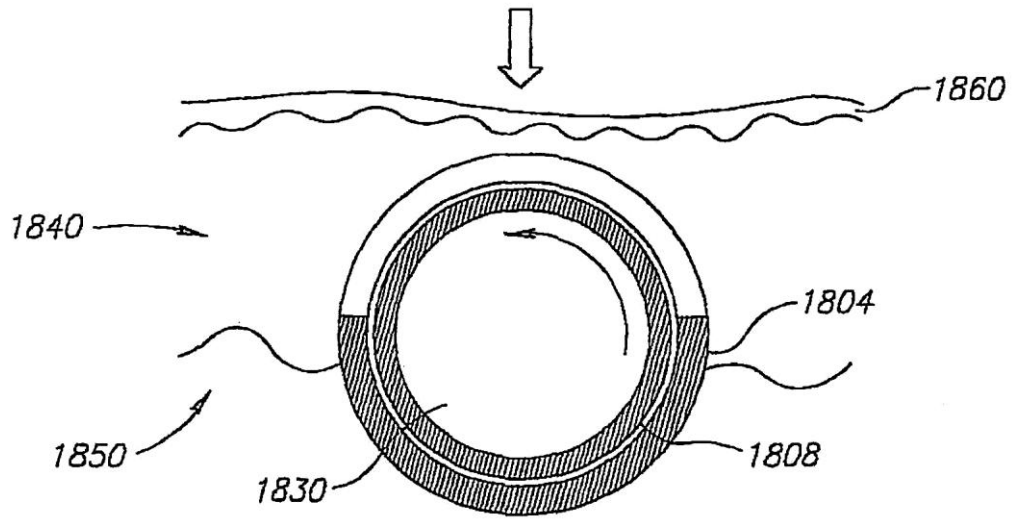


FIG.19

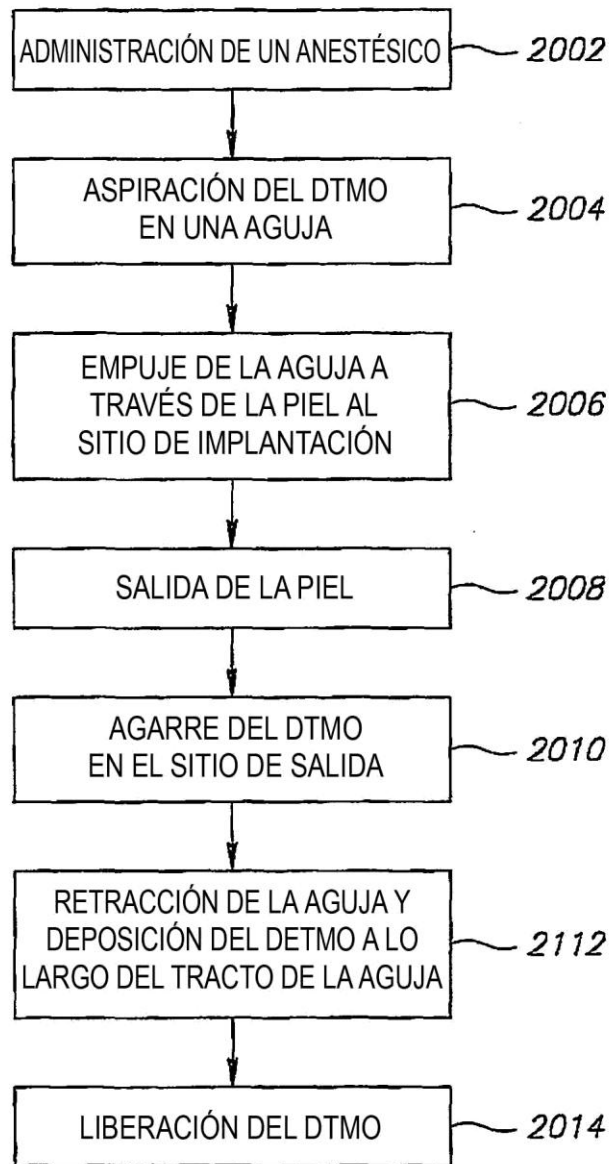


FIG.20

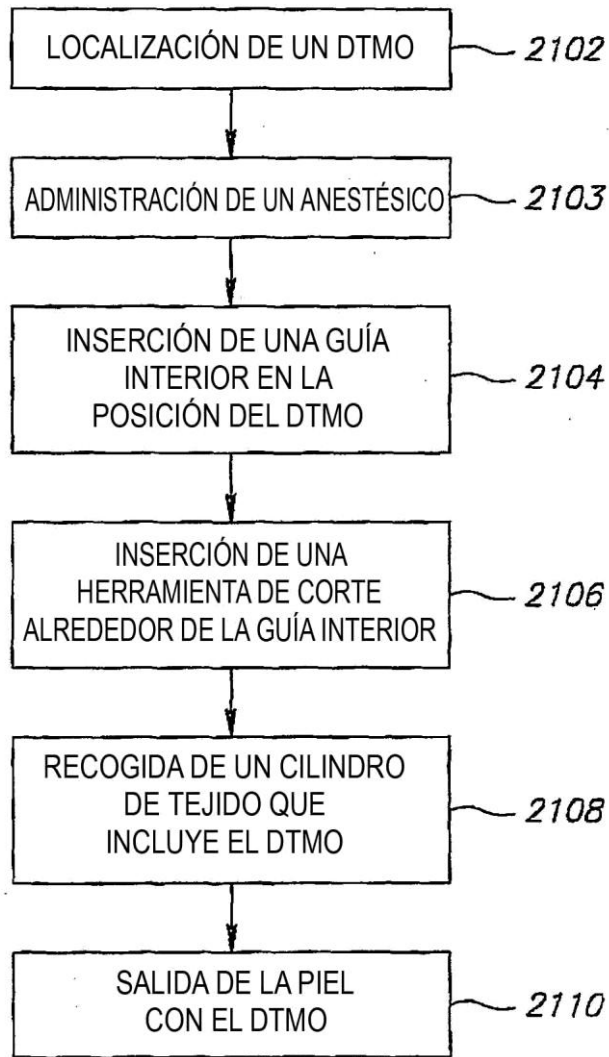


FIG.21

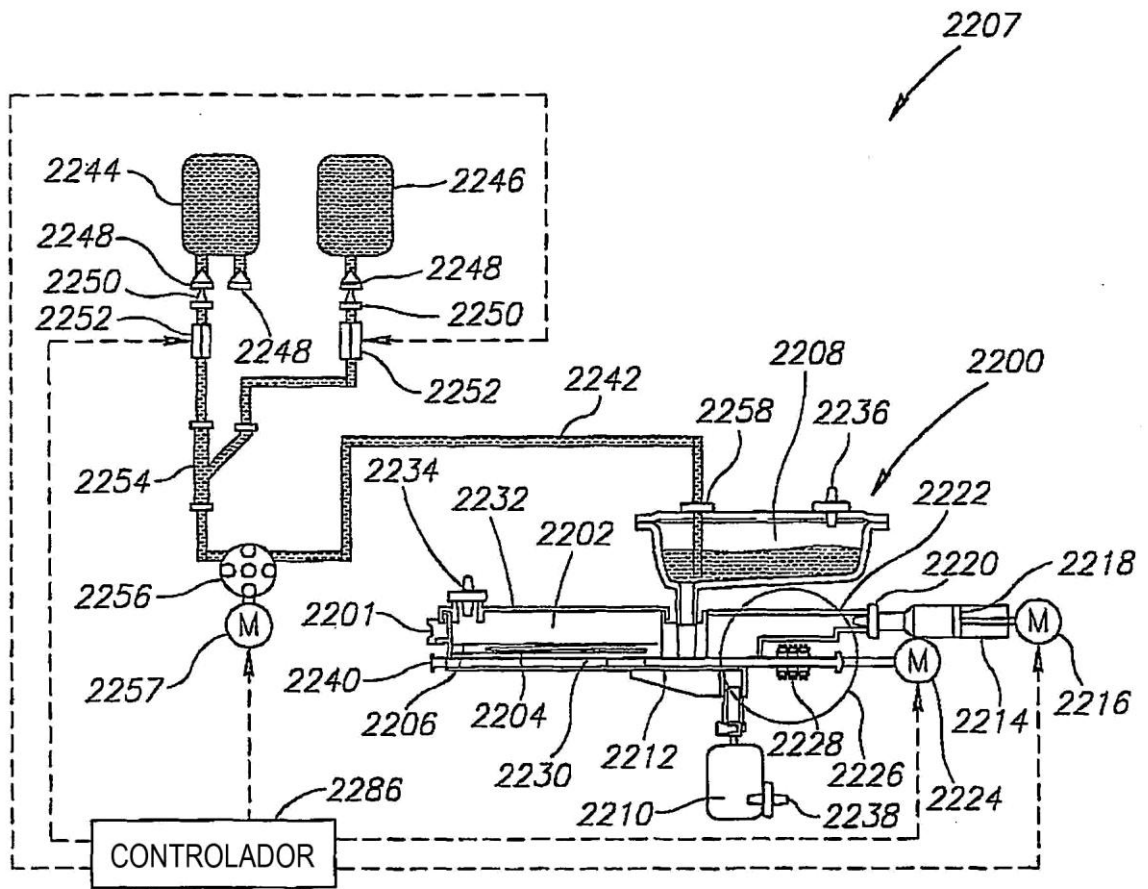


FIG.22