

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 324**

51 Int. Cl.:

A61F 2/10 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)

A61L 27/60 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2009 PCT/US2009/063217**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2010 WO2010053948**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2009 E 09825325 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2352472**

54 Título: **Equivalentes de piel secos e irradiados listos para su uso**

30 Prioridad:

04.11.2008 US 111153 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2017

73 Titular/es:

STRATATECH CORPORATION (100.0%)
505 South Rosa Road Suite 169
Madison, Wisconsin 53719, US

72 Inventor/es:

COMER, ALLEN, R.;
ALLEN-HOFFMANN, B., LYNN y
STEIGLITZ, BARRY

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 621 324 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

Equivalentes de piel secos e irradiados listos para su uso

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a sistemas y métodos para el almacenamiento a largo plazo de equivalentes de piel refrigerados o a temperatura ambiente fabricados por cultivo organotípico.

10 Antecedentes

El campo emergente de la ingeniería de tejidos (IT) está posicionado para producir un progreso enorme en el tratamiento de enfermedades y disfunciones de órganos en la próxima década. En 2001, había 23 agentes terapéuticos aprobados para su comercialización en los Estados Unidos (EE. UU.) y Europa, de los cuales nueve eran sustitutos o injertos de piel, y 100 productos más estaban en desarrollo. (De Bree, Genomics-based Drug Data Report and Regenerative Therapy (1) 2:77-96 (2001)). En 2007, casi 100 compañías estaban implicadas en el desarrollo de tejidos creados por ingeniería, agentes terapéuticos basados en células, o tecnologías relacionadas (Applied Data Research, Febrero 2007). La industria en total tuvo una tasa de crecimiento anual de un 16% desde 1995-2001. El segmento de la industria "estructural" (por ejemplo, piel, hueso, cartílago) presentó un 85% de crecimiento desde 1998-2001. En 2004, el mercado en EE. UU. de replazos/sustitutos de piel con tejidos creados por ingeniería y los moduladores activos de reparación de heridas se valoró en aproximadamente 195 millones de \$. Se espera que las ventas crezcan a una tasa anual compuesta del 9,5%, alcanzando aproximadamente 481 millones de \$ en el año 2014 (MedTech Insight, Windhover Information, Septiembre 2005). El mercado total de EE. UU. de tecnologías avanzadas para tratar las heridas tenía un valor de más de 2,3 billones de \$ en 2005. Se ha proyectado que crecerá con una tasa media de crecimiento anual del 12,3% durante un periodo de cinco años alcanzando los 4,6 billones de \$ en 2011 (BCC Research, PHM011E, Enero 2007). El mercado global del tratamiento de heridas se estima que tendrá un valor de 7,2 billones de \$ estadounidenses en 2006 y comprende dos sectores, el tradicional y el avanzado (Espicom Business Intelligence, 2007). Los productos tradicionales para el tratamiento de heridas consisten principalmente en vendajes basados en gasa de baja tecnología tales como esponjas de tejido o sin tejido, vendajes de conformación y vendajes no adherentes. El segmento de tratamiento avanzado de heridas (4,1 billones de \$ estadounidenses en global) es el área de crecimiento más rápido con un crecimiento de dos dígitos del 10% por año (Espicom Business Intelligence, 2007).

Aunque existe una multitud de aplicaciones revolucionarias y económicamente importantes para los tejidos y órganos creados por ingeniería en el área de salud humana, el potencial económico completo de la industria está lejos de conseguirse. En este momento, solo una de las compañías de ingeniería de tejidos que cotizan en bolsa en todo el mundo, presenta beneficios a pesar de que la inversión global en estas tecnologías excede los 3,5 billones de \$ (Lysaght y Reyes, Tissue Engineering 7(5):485-93 (2001)).

Una barrera principal para la aceptación de tejidos creados por ingeniería por parte de los facultativos médicos, proveedores de la salud y aseguradoras de salud es la falta de medios para conservar y almacenar eficaz y eficientemente los tejidos creados por ingeniería. La naturaleza de los productos de células y tejidos vivos hace que el almacenamiento a largo plazo sea impracticable. Los tejidos creados por ingeniería actuales a menudo se deben almacenar y transportar en condiciones controladas cuidadosamente para mantener la viabilidad y la función. Normalmente los productos tisulares creados por ingeniería necesitan semanas o meses para producirse pero se tienen que utilizar en horas o días tras la fabricación. Como resultado, las compañías de IT tienen que operar con sus instalaciones de producción a máxima capacidad y absorber los costes del producto que no se vende que se tiene que desechar. Estas pérdidas de inventario, además del ya costoso proceso de fabricación, han forzado que los precios alcancen niveles que no son prácticos. A modo de ejemplo específico, el APLIGRAF necesita aproximadamente cuatro semanas para fabricarse, se puede utilizar solamente en diez días, y se tiene que mantener entre 20 y 23 °C hasta su uso. En otro ejemplo, el EPICEL es transportado por una enfermera desde las instalaciones de producción de Genzyme Biosurgery en Cambridge, MA hasta el punto de uso en una incubadora portátil y se utiliza inmediatamente al llegar. Dichos inconvenientes representan desafíos significativos para el desarrollo de productos convenientes y baratos.

Se ha explorado la crioconservación como una solución al problema de almacenamiento, pero se sabe que induce daños tisulares por la formación de hielo, lesiones por frío, y desequilibrio osmótico. Junto con el APLIGRAF, el otro único equivalente de piel vivo aprobado, el ORCEL, actualmente en ensayos clínicos es un producto congelado que tiene el inconveniente de que se tiene que mantener a temperaturas por debajo de -100 °C antes de su uso. Esto necesita condiciones especializadas de suministro y almacenamiento del producto, que incluye el uso de materiales peligrosos durante el transporte, y el uso de nitrógeno líquido en el almacenamiento, que es caro, peligroso y no disponible fácilmente en clínicas rurales y hospitales de campo. Además, el suministro de un producto congelado necesita un entrenamiento especial por parte del usuario final para descongelar satisfactoriamente el tejido antes de su uso.

El documento WO 2004/110372 A2 desvela composiciones y métodos para congelar y/o secar órganos para su

almacenamiento antes de su uso. Las composiciones y métodos desvelados en este documento utilizan células modificadas genéticamente que son viables tras la descongelación y/o rehidratación y que forman órganos.

El documento WO 2005/012492 A2 desvela composiciones para cerrar heridas y métodos para producirlas. Las células que se utilizan en las composiciones de este documento expresan polipéptidos exógenos tales como polipéptidos antimicrobianos.

En consecuencia, lo que se necesita en la técnica son métodos mejorados para preparar tejidos y células creados por ingeniería para su almacenamiento en condiciones que estén disponibles de manera rutinaria en el punto de uso. Como todas las instalaciones clínicas tienen un almacén refrigerado, el desarrollo de un equivalente de piel que se pueda almacenar durante periodos prolongados en un refrigerador convencional mejoraría enormemente la disponibilidad y utilidad clínica de estos productos. El desarrollo de un equivalente de piel que se pueda almacenar durante periodos prolongados a temperatura ambiente aumentaría adicionalmente la disponibilidad de dichos productos para su uso inmediato en el campo de batalla o en una variedad de situaciones de respuesta inmediata.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere en general a sistemas y métodos para el almacenamiento a largo plazo de equivalentes de piel a temperatura de refrigeración o ambiente producidos por un cultivo organotípico. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para conservar un equivalente de piel cultivado organotípicamente para su uso como un vendaje de heridas como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas, que comprende: proporcionar dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente que comprende células NIKS y un envase; tratar dicho equivalente de piel para dar lugar a células no viables en el equivalente de piel; y envasar dicho equivalente de piel para proporcionar un equivalente de piel envasado. La presente invención no se limita a un método para tratar el equivalente de piel para que dé lugar a que las células que constituyen el equivalente de piel sean no viables. En algunas realizaciones, la etapa de tratamiento comprende la irradiación de dicho equivalente de piel envasado de manera que dicho equivalente de piel sea estéril y no viable. En algunas realizaciones, la radiación se lleva a cabo con radiación gamma. En algunas realizaciones, la etapa de tratamiento comprende el secado de dicho equivalente de piel en condiciones tales que las células de dicho equivalente de piel se conviertan en no viables. La presente invención no se limita a cualquier método particular de secado. En algunas realizaciones, el secado se lleva a cabo por un método que se selecciona de entre el grupo que consiste en secado al vacío y secado por congelación. La presente invención no se limita a un orden particular de etapas, a menos de que se indique otra cosa. En algunas realizaciones, el tratamiento se aplica antes del envasado. En algunas realizaciones el tratamiento se aplica tras el envasado. En algunas realizaciones, el tratamiento comprende el secado de dicho equivalente de piel en condiciones en las que dichas células producen que dicho equivalente de piel se convierta en no viable e irradiando dicho equivalente de piel en condiciones en las que dicho equivalente de piel se convierte en estéril. En algunas realizaciones, la etapa de secado se produce antes de dicho envasado y dicha etapa de radiación se produce después de dicha etapa de envasado.

La presente invención no está limitada al uso de un equivalente de piel en particular que comprenda células NIKS. El equivalente de piel cultivado organotípicamente comprende células NIKS. En algunas realizaciones, las células NIKS comprenden una secuencia de ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido exógeno. En algunas realizaciones, se expresan más de un polipéptido exógeno por las células que producen este equivalente de piel. La presente invención no está limitada al uso de un polipéptido exógeno en particular. En algunas realizaciones, el polipéptido exógeno es un polipéptido antimicrobiano. En algunas realizaciones, el polipéptido exógeno se selecciona de entre el grupo que consiste en beta-defensina 1 humana, beta-defensina 2 humana, beta-defensina 3 humana, y catelicidina. En algunas realizaciones, el polipéptido antimicrobiano se proporciona en el equivalente de piel en una cantidad de desde 1 a 1000 ng de polipéptido antimicrobiano por mililitro de una solución de extracción superficial. En algunas realizaciones preferidas, el polipéptido antimicrobiano se proporciona en el equivalente de piel en una cantidad de desde 1 a 1000 ng de polipéptido de un polipéptido antimicrobiano de solución de extracción superficial. En algunas realizaciones, el equivalente de piel se seca hasta un peso final de menos del 75%, 50%, 25% o preferentemente del 15% del equivalente de piel húmedo o no secado. En algunas realizaciones, el equivalente de piel, tras la rehidratación, tiene un valor de DPM inicial de desde aproximadamente 20 DPM a aproximadamente 300 DPM, preferentemente desde aproximadamente 70 a aproximadamente 140 DPM, y un valor de cambio de DPM de desde aproximadamente 5 DPM a aproximadamente 400 DPM, preferentemente desde aproximadamente 10 DPM a aproximadamente 220 DPM. En algunas realizaciones, el equivalente de piel, tras la rehidratación, tiene una fuerza de tensión de desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 MPa, preferentemente desde aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,8 MPa. En algunas realizaciones, el envase se puede sellarse por calor.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un equivalente de piel humana envasado producido por los métodos anteriores. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un equivalente de piel humana estéril envasado que se produce por los métodos anteriores.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un equivalente de piel humana in vitro, no viable, aislado que comprende células NIKS. En algunas realizaciones, el equivalente de piel

está envasado. En algunas realizaciones, el equivalente de piel es estéril. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel estériles están irradiados. En algunas realizaciones el equivalente de piel está seco. En algunas realizaciones, el equivalente de piel tiene un peso de menos del 50% del peso de un equivalente de piel húmedo. El equivalente de piel comprende células NIKS. En algunas realizaciones, las células NIKS comprenden una secuencia de ácido nucleico exógena que codifica un polipéptido exógeno. En algunas realizaciones, se expresa más de un polipéptido exógeno por las células que producen el equivalente de piel. La presente invención no se limita al uso un polipéptido exógeno en particular. En algunas realizaciones, el polipéptido exógeno es un polipéptido antimicrobiano. En algunas realizaciones, el polipéptido antimicrobiano se selecciona de entre el grupo que consiste en beta-defensina 1 humana, beta-defensina 2 humana, beta-defensina 3 humana y catelicidina. En algunas realizaciones, el polipéptido antimicrobiano se proporciona por el equivalente de piel en una cantidad de desde 1 a 1000 ng de polipéptido antimicrobiano por mililitro de una solución de extracción superficial, en algunas realizaciones preferidas, el polipéptido antimicrobiano se proporciona por el equivalente de piel en una cantidad de desde 1 a 1000 ng de polipéptido antimicrobiano por mililitro de una solución de extracción superficial. En algunas realizaciones, el equivalente de piel se seca hasta un peso final de menos del 75%, 50%, 25% o preferentemente del 15% del de un equivalente de piel húmedo o no secado. En algunas realizaciones, el equivalente de piel, tras la rehidratación, tiene un valor de DPM inicial de desde aproximadamente 20 DPM a aproximadamente 300 DPM, preferentemente desde aproximadamente 70 a aproximadamente 140 DPM, y un valor de cambio de DPM de desde aproximadamente 5 DPM a aproximadamente 400 DPM, preferentemente desde aproximadamente 10 DPM a aproximadamente 220 DPM. En algunas realizaciones, el equivalente de piel, tras la rehidratación, tiene una fuerza de tensión de desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5,0 MPa, preferentemente desde aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,8 MPa.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para tratar un sujeto que comprende la provisión de una composición de equivalente de piel como se ha descrito anteriormente y aplicando dicho equivalente de piel en una herida en condiciones en las que dicho equivalente de piel se pone en contacto con dicha herida. En algunas realizaciones, el equivalente de piel se aplica en dicha herida temporalmente.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits que comprenden un envase que contiene la composición de equivalente de piel que se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el equivalente de piel tiene una vida en almacén de aproximadamente un mes a aproximadamente seis meses.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden un equivalente de piel cultivado organotípicamente in vitro, aislado, no viable que tiene un peso de menos del 50% del peso de un equivalente de piel húmedo. En algunas realizaciones, las composiciones comprenden al menos un polipéptido antimicrobiano expresado por células que integran dicho equivalente de piel.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona el uso de las composiciones anteriores para tratar un sujeto. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona el uso de las composiciones anteriores para tratar una herida en un sujeto.

Descripción de las figuras

Figura 1. Viabilidad de los tejidos tras la radiación. Se irradiaron los tejidos 9F1 y 2D2, y se recolectaron biopsias con un troquel a los 3, 7, o 14 días tras la radiación y se analizaron en cuanto a su viabilidad utilizando un ensayo MTT. Los datos representan las medias $\pm$ la desviación estándar medidas en al menos tres muestras de biopsia independientes en cada grupo de tratamiento.

Figura 2. Ensayo de viabilidad/migración de queratinocitos (A). Se valoraron los explantes que no mostraban crecimiento de queratinocitos como negativos en cuanto a queratinocitos viables. (B) Las muestras en las que los queratinocitos migraban alrededor del extremo de la dermis se valoraron como positivas en cuanto a queratinocitos viables.

Figura 3. Ensayo de crecimiento de fibroblastos. Se trataron con collagenasa las biopsias de tejidos 9F1 de control y radiados, y se cultivaron las células aisladas durante 6 días antes de la tinción con un 1% de azul de metileno para visualizar las colonias de células.

Figura 4. Proteína liberada por tejidos 2D2 y 9F1 radiados. Los tejidos sustitutos de piel humana se irradiaron a una dosis de 0, 1, o 5 kGy. Se extrajeron las proteínas en agua a partir de biopsias con troquel recolectadas a los 3 días tras la radiación y se cuantificaron por el ensayo BCA. Los datos representan los valores medios $\pm$ la desviación estándar de cuatro mediciones.

Figura 5. Actividad antimicrobiana de tejidos 2D2 radiados. Se incubaron las biopsias con troquel obtenidas de tejidos 2D2 no radiados y radiados durante los tiempos indicados en medios de cultivo libres de suero. La actividad antimicrobiana del material extraído de estos tejidos se determinó por recuento de UFC y se normalizó frente a los cultivos bacterianos de control. Cada punto de datos representa los valores medios que se obtienen de dos muestras independientes.

Figura 6. Actividad antimicrobiana de tejidos 9F1 radiados. Se incubaron las biopsias con troquel obtenidas de tejidos 9F1 no radiados y radiados durante 4 h en un medio de cultivo libre de suero. La actividad antimicrobiana de estos tejidos se determinó por recuento de las UFC y se normalizaron frente a cultivos bacterianos de control, cuyo valor se fijó en 1. Cada punto de datos representa los valores medios +/- la desviación estándar de cuatro muestras de biopsia de los tejidos en el grupo de tratamiento indicado.

Figura 7. Actividad antimicrobiana de tejidos 2D2 radiados. Se incubaron las biopsias con troquel obtenidas de tejidos 2D2 no radiados y radiados durante 4 h en un medio de cultivo libre de suero. La actividad antimicrobiana de estos tejidos se determinó por recuento de las UFC y se normalizaron frente a cultivos bacterianos de control, cuyo valor se fijó en 1. Cada punto de datos representa los valores medios +/- la desviación estándar de cuatro muestras de biopsia de los tejidos en el grupo de tratamiento indicado.

Figura 8. Proteína liberada total de tejidos equivalentes de piel almacenados en geles nutritivos o en gasa no adherente. Los tejidos equivalentes de piel humana se irradiaron y se recolectaron biopsias con troquel tras 14 días y se incubaron en 0,2 ml de agua estéril a 37 °C durante 24 h. La proteína extraída se cuantificó por un ensayo BCA. Los datos representan valores medios +/- la desviación estándar de cuatro mediciones.

Figura 9. Análisis histológico de los equivalente de piel creados por ingeniería radiados secados por congelación. Los equivalentes de piel recientes se compararon con equivalentes de piel que se habían secado por congelación, o secados por congelación y radiados con un nivel de dosis de 1 kGy, 5 kGy, o 25 kGy. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina/eosina y se fotografiaron con una magnificación de 400x. Barra de escala = 200 µm.

Figura 10. Análisis histológico de equivalentes de piel creados por ingeniería irradiados secados al vacío. Equivalente de piel recientes se compararon con equivalentes de piel que se habían secado al vacío o secado al vacío y radiados con un nivel de dosis de 1 kGy, 5 kGy, o 24 kGy. Las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina/eosina y se fotografiaron con una magnificación de 400x. Barra de escala = 200 µm.

Figura 11. Viabilidad de equivalentes de piel irradiados secados al vacío y secados por congelación. Los colores de las barras representan (de izquierda a derecha): negro = 0 kGy (no radiado); gris oscuro = 1 kGy; gris claro = 5 kGy; blanco = 25 kGy. Los puntos de datos representan la media +/- desviación estándar (n = 4-8), normalizados con tejido equivalente de piel no radiado recién preparado.

Figura 12. Función de barrera epidérmica de equivalentes de piel radiados secos. *Panel de la Izquierda.* El cambio de la capacitancia eléctrica de la superficie tisular se midió durante intervalos de 10 segundos para los tejidos de piel creados por ingeniería, secados por congelación o secados al vacío, radiados a 1 kGy, 5 kGy, o 25 kGy. Los valores representan la media +/- la desviación estándar de dos mediciones de cada uno de los dos tejidos independientes. *Panel de la derecha.* Se exponen los valores de DPM inicial para los tejidos secados por congelación o secados al vacío, radiados a 1 kGy, 5 kGy, o 25 kGy. Los colores de las barras representan (de izquierda a derecha): negro = 0 kGy (no radiado); gris oscuro = 1 kGy; gris claro = 5 kGy; blanco = 25 kGy. Los valores representan la media +/- la desviación estándar de dos mediciones de cada uno de los dos tejidos independientes.

Figura 13. Propiedades mecánicas de tejidos de piel creados por ingeniería, secados y radiados. Los colores de las barras representan (de izquierda a derecha): negro = 0 kGy (no radiado); gris oscuro = 1 kGy; gris claro = 5 kGy; blanco = 25 kGy. Los datos son la media $\pm$ std. n = 2-4.

Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones “equivalente de piel”, “equivalente de piel humana”, “sustituto de piel humana”, y “cultivos organotípicos” se utilizan de manera intercambiable para hacer referencia a un cultivo derivado in vitro de queratinocitos que se han estratificado en un epitelio escamoso. Normalmente, los equivalentes de piel se producen por cultivo organotípico e incluyen una capa dérmica junto con una capa de queratinocitos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “equivalente de piel húmedo” se refiere a un equivalente de piel en cultivo organotípico o retirado inmediatamente de un cultivo organotípico.

Como se utiliza en el presente documento, “no viable” se refiere a células que no están vivas como se determina por un ensayo tal como un ensayo MTT.

Como se utiliza en el presente documento el término “estéril” se refiere a un equivalente de piel que está esencialmente o completamente libre de contaminación microbiana o fúngica.

Como se utiliza en el presente documento, el término “secado” se refiere a una composición de la que se ha extraído la humedad. Un “equivalente de piel seco” es un equivalente de piel al que se ha extraído la humedad de forma

que el equivalente de piel seco tiene un contenido de humedad menor que un equivalente de piel húmedo, o retirado inmediatamente de un cultivo organotípico. La comparación de la peso del equivalente de piel seco con respecto al equivalente de piel húmedo se utiliza como una medida de la extensión del seco y refleja la cantidad de humedad extraída del equivalente de piel durante el procedimiento de seco.

5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “células NIKS” se refiere a células que tienen las características de las células depositadas como la línea celular ATCC CRL-1219.

10 El término “homología” se refiere a un grado de complementariedad. Puede ser una homología parcial o una homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es la que al menos inhibe parcialmente una secuencia completamente complementaria de la hibridación con un ácido nucleico diana y a la que se hace referencia utilizando el término funcional “sustancialmente homóloga”. La expresión “inhibición de la unión”, cuando se utiliza en referencia a la unión de ácidos nucleicos, se refiere a la inhibición de la unión producida por la competición de secuencias homólogas por la unión con una secuencia diana. La inhibición de la hibridación de la
15 secuencia completamente complementaria a la secuencia diana se puede examinar utilizando un ensayo de hibridación (transferencia de Southern o Northern, hibridación en solución, y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Esto no quiere decir que las condiciones de baja rigurosidad sean tales que permitan las uniones no específicas; las condiciones de baja rigurosidad necesitan que la unión de las dos secuencias entre ellas sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica se puede ensayar utilizando una
20 segunda diana que carezca incluso de un grado parcial de complementariedad (por ejemplo, menos de aproximadamente el 30% de identidad); en ausencia de unión no específica, la sonda no se hibridará a la segunda diana no complementaria.

25 El término “gen” se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende las secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido o precursor (por ejemplo, KGF-2). El polipéptido puede codificarse por una secuencia codificante de longitud completa o por una parte de la secuencia codificante siempre que se mantengan la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión al ligando, transducción de la señal, etc.) del de longitud completa o fragmento. El término también engloba la región codificante de un gen estructural y las secuencias que lo incluyen localizadas adyacentes a la región codificante
30 tanto hacia el extremo 5' como 3' en una distancia de aproximadamente 1 kb hacia cada extremo de manera que el gen se corresponde con la longitud del ARNm de longitud completa. Se hace referencia a las secuencias que se localizan 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm como secuencias 5' no traducidas. Se hace referencia a las secuencias que se localizan 3' de la región codificante y que están presentes en el ARNm como secuencias 3' no traducidas. El término “gen” engloba tanto el ADNc como las formas genómicas de un gen. Una
35 forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominados “intrones” o “regiones de intervención” o “secuencias de intervención”. Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en el ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como amplificadores. Los intrones se retiran o “se cortan” de la transcripción nuclear o primaria; los intrones por lo tanto están ausentes en la transcripción en ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para
40 especificar la secuencia o el orden de aminoácidos en un polipéptido emergente.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones “molécula de ácido nucleico codificante”, “secuencia codificante de ADN” y “ADN codificante” se refiere al orden o secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una
45 cadena de ácido desoxirribonucleico. El orden de esos desoxirribonucleótidos determina el orden de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica (proteína). La secuencia de ADN codifica por lo tanto la secuencia de aminoácidos.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión “molécula de ADN recombinante” se refiere a una molécula de ADN que está compuesto por segmentos de ADN que se unen juntos por medio de técnicas biológicas
50 moleculares.

Como se utiliza en el presente documento, el término “purificado” o “purificar” se refiere a la retirada de contaminantes de una muestra.

55 Como se utiliza en el presente documento, el término “vector” se utiliza en referencia a moléculas de ácido nucleico que transfieren segmentos de ADN de una célula a otra. El término “vehículo” se utiliza a veces de manera intercambiable con “vector”.

60 La expresión “vector de expresión” como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia codificante deseada y secuencias de ácido nucleico apropiadas para la expresión de la secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión en procariotas habitualmente incluyen un promotor, un operador (opcional), y un sitio de unión al ribosoma, a menudo junto con otras secuencias. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, amplificadores, y señales de terminación y poliadenilación.

65 “Unidos operativamente” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos se relacionan

permitiéndoles funcionar de la manera que se pretende. Una secuencia reguladora está “unida operativamente” a una secuencia codificante cuando se unen de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con la secuencia reguladora.

- 5 El término “transfección” como se utiliza en el presente documento, se refiere a la introducción de un ADN ajeno en células eucariotas. La transfección se puede conseguir por una variedad de medios que se conocen en la técnica incluyendo la co-precipitación de fosfato de calcio-ADN, fusión de liposomas, lipofección, fusión de protoplastos, infección retroviral, y biolística.
- 10 La expresión “transfección estable” o “transfectado establemente” se refiere a la introducción e integración de un ADN ajeno en el genoma de la célula transfectada. La expresión “transfectante estable” se refiere a una célula que ha integrado establemente el ADN ajeno en el ADN genómico.
- 15 La expresión “transfección transitoria” o “transfectado transitoriamente” se refiere a la introducción de ADN ajeno en una célula en la que el ADN ajeno no se integra en el genoma de la célula transfectada. El ADN ajeno persiste en el núcleo de la célula transfectada durante varios días. Durante este tiempo, el ADN ajeno se somete a los controles reguladores que gobiernan la expresión de genes endógenos de los cromosomas. La expresión “transfectante transitorio” se refiere a células que han captado el ADN ajeno pero que no integran este ADN.
- 20 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “polipéptido antimicrobiano” se refiere en general a polipéptidos cortos, de 5 a 100 aminoácidos de longitud, que presentan actividad antimicrobiana. Ejemplos de polipéptidos antimicrobianos incluyen, pero no se limitan a, beta-defensinas humanas 1, 2 y 3 y catelicidina. Las secuencias de una amplia variedad de polipéptidos antimicrobianos en el alcance de la invención se conocen y están disponibles, incluyendo las que se identifican en el documento WO 05/012.492, que se incorporan por
- 25 referencia en el presente documento en su totalidad.

Descripción detallada

- 30 La presente invención se refiere en general a sistemas y métodos para preparar, transportar y almacenar equivalentes de piel producidos por cultivo organotípico. En particular, la presente invención se refiere a los métodos para secar o radiar equivalentes de piel humana para eliminar la viabilidad del equivalente de piel, de manera que se pueda almacenar durante periodos prolongados y se transportan en condiciones convencionales para su uso en el campo, o su uso en el sitio, en oposición a su uso en un hospital.
- 35 La planificación médica fue una parte crítica de la Operación de Libertad Iraquí e incluía modelos predictivos del número esperado de urgencias por quemaduras (Barillo, D.J., et al., Tracking the daily availability of burn beds for national emergencies. J Burn Care Rehabil, 2005. 26(2): p. 174-82). En estos modelos se estima que las urgencias excedían la capacidad del único centro de quemaduras del Departamento de Defensa. El Departamento de Defensa en conjunción con la Asociación de Americana de quemados desarrollaron un plan masivo de urgencias basándose
- 40 en las prácticas actuales y la tecnología disponible para tratar quemaduras. En la primera Guerra del Golfo se supo que el ejército enemigo disponía de armas químicas incluyendo mostaza sulfúrica. En los conflictos Iraquí y en Afganistán, el número de quemaduras en el campo ha alcanzado nuevos niveles. Las quemaduras cutáneas térmicas y químicas vesiculosas (ampollosas), así como los procedimientos de descostrado y desbridamiento que se utilizan comúnmente para tratar estas lesiones, daban lugar a heridas abiertas susceptibles a la infección por
- 45 patógenos bacterianos.

- Desafortunadamente, en los últimos 25 años ha habido una falta significativa de desarrollo de tecnologías innovadoras, que salven vidas, para el tratamiento de quemaduras cutáneas o heridas vesiculosas. La necesidad de innovaciones en esta área se enfatizó en la conferencia del 25-28 de octubre de 2006 titulada “Estado de la Ciencia
- 50 de la Investigación de quemaduras” financiada por el Instituto de Ciencias Médicas Generales. La piel de un cadáver humano radiada con rayos gamma es estable a temperatura ambiente y se ha utilizado satisfactoriamente en el tratamiento de defectos cutáneos (Rosales, M.A., M. Bruntz, y D.G. Armstrong, Gamma-irradiated human skin allograft: a potential treatment modality for lower extremity ulcers. Int Wound J, 2004. 1(3): p. 201-6; Cancio, L.C., et al., Burn support for Operation Iraqi Freedom and related operations, 2003 to 2004. J Burn Care Rehabil, 2005. 26(2): p. 151-61). Sin embargo, dichos productos no están indicados para el uso en heridas que presenten evidencias de infección. Las heridas cutáneas, como las que resultan del a exposición a agentes vesicantes y lesiones térmicas, proporcionan un ambiente ideal para el crecimiento bacteriano y las complicaciones que radican en la sepsis de la herida (Milner, S.M. y M.R. Ortega, Reduced antimicrobial peptide expression in human burn wounds. Burns, 1999. 25(5): p. 411-3).
- 60

- En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un equivalente de piel creado por ingeniería de tejidos, seco o irradiado, antimicrobiano, listo para su uso en el campo para su uso en el tratamiento de lesiones cutáneas vesiculosas, térmicas y traumáticas. Los equivalentes de piel, secos o radiados, se diseñan para un almacenamiento a largo plazo a temperaturas ambientes y con máxima versatilidad y seguridad para los pacientes con una lesión
- 65 vesiculosa, térmica, o traumática en el epitelio externo. En realizaciones preferidas, los equivalentes de piel, secos o radiados se crean por ingeniería para suministrar β -defensina 3 (hBD-3) o catelicidina (hCAP18/LL-37) peptídicas de

amplio espectro para defender a un huésped humano en el lecho de la herida.

En consecuencia, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un equivalente de piel humana seco o radiado que comprende células no viables. En algunas realizaciones, el equivalente de piel se ha creado por ingeniería para que exprese y proporcione polipéptidos antimicrobianos exógenos, preferentemente β -defensinas humanas 1, 2 y 3 o catelicidina (hCAP18/LL37). En algunas realizaciones, los equivalentes de piel no viables se aplican a las heridas. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel humana no viables se aplican temporalmente a las heridas. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel humana no viables se retiran y se reemplazan con equivalentes de piel humana no viables adicionales proporcionando el mismo polipéptido antimicrobiano. En otras realizaciones, los equivalentes de piel no viables se retiran y reemplazan con equivalentes de piel no viables adicionales que proporcionan un polipéptido antimicrobiano diferente. En otras realizaciones, los equivalentes de piel humana no viables se retiran antes de la aplicación de un equivalente de piel viable o un injerto de piel permanente en la herida (por ejemplo, una herida por quemadura).

En realizaciones preferidas, los equivalentes de piel de la presente invención se crean por ingeniería para expresar un polipéptido antimicrobiano exógeno. La presente invención no se limita al uso de un polipéptido antimicrobiano en particular. En realizaciones preferidas, el polipéptido antimicrobiano es la β -defensina humana 1, β -defensina humana 2, β -defensina humana 3, o catelicidina (hCAP18/LL37) o una variante. En algunas realizaciones preferidas, las construcciones de ácido nucleico o vectores que codifican el polipéptido antimicrobiano se introducen en los queratinocitos (por ejemplo, células NIKS) y los queratinocitos transfectados se utilizan para fabricar el equivalente de piel por técnicas de cultivo organotípico. Se proporcionan realizaciones preferidas para la producción de equivalentes de piel que expresan polipéptidos exógenos, así como polipéptidos antimicrobianos de tipo silvestre y variantes, en la Solicitud relacionada 10/909.119, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento por referencia.

A) Equivalentes de piel producidos por cultivo organotípico

La presente invención no se limita al uso de una fuente particular de células que sean capaces de diferenciarse en un epitelio escamoso. Además, la presente invención contempla el uso de una variedad de líneas celulares y fuentes que pueden diferenciarse en un epitelio escamoso, incluyendo tanto los queratinocitos primarios e inmortalizados. Las fuentes de células incluyen los queratinocitos y fibroblastos dérmicos obtenidos por biopsia de donantes humanos y cadáveres (Auger et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal* 36:96-103; Pat de EE. UU. N° 5.968.546 y 5.693.332, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia), prepucios neonatales (Asbill et al., *Pharm. Research* 17(9): 1092-97 (2000); Meana et al., *Burns* 24:621-30 (1998); Pat de EE. UU. N° 4.485.096; 6.039.760; y 5.536.656, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia), y líneas celulares de queratinocitos inmortalizados tales como las células NM1 (Baden, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23(3):205-213 (1987)), HaCaT cells (Boucamp et al., *J. cell. Boil.* 106:761-771 (1988)); y células NIKS (Línea celular BC-1-Ep/SL; Pat de EE. UU. N° 5.989.837, incorporada en el presente documento por referencia; ATCC CRL-12191). Cada una de estas líneas celulares se pueden cultivar o modificar genéticamente con el fin de producir una línea celular capaz de expresar o co-expresar la proteína(s) deseada. En realizaciones particularmente preferidas, se utilizan las células NIKS. El descubrimiento de una nueva línea celular de queratinocitos humanos (queratinocitos inmortalizados casi diploides o NIKS) proporciona una oportunidad para modificar genéticamente queratinocitos humanos con vectores no víricos. La única ventaja de las células NIKS es que son una fuente constante de queratinocitos humanos genéticamente uniformes, libres de patógenos. Por esta razón, son útiles para la aplicación de estrategias de modificación genética y expresión genética genómica para proporcionar cultivos de equivalentes de piel con propiedades mejoradas por encima de las tecnologías disponibles actualmente y los productos tisulares de piel. La línea celular de queratinocitos NIKS, identificada y caracterizada en la universidad de Wisconsin, no es tumorigénica, presenta un cariotipo estable, y presenta un crecimiento y diferenciación normales tanto en monocapa como en cultivo organotípico. Las células NIKS forman equivalentes de piel completamente estratificados en cultivo. Estos cultivos no se pueden distinguir en ninguno de los criterios ensayados de los cultivos organotípicos formados a partir de queratinocitos humanos primarios. Sin embargo, a diferencia de las células primarias, las células NIKS inmortalizadas continuarán proliferando en un cultivo monocapa indefinidamente. Esto proporciona una oportunidad para modificar genéticamente las células y aislar nuevos clones de células con nuevas propiedades útiles (Allen-Hoffmann et al., *J. Invest. Dermatol.*, 114(3): 444-455 (2000)).

Las células NIKS provienen de la cepa BC-1-Ep de queratinocitos del prepucio humano neonatal aislada de bebés niños aparentemente normales. En los primeros pasajes, las células BC-1-Ep no presentan características morfológicas o de crecimiento que fueran atípicas para los queratinocitos humanos normales en cultivo. Las células BC-1-Ep cultivadas presentaban estratificación así como características de muerte celular programada. Para determinar la vida útil de replicación, las células BC-1-Ep se cultivaron en serie hasta la senescencia en medio de cultivo de queratinocitos convencional a una densidad de 3×10^5 células por placa de 100 mm y se hacían pasajes a intervalos semanales (aproximadamente una división de 1:25). Sobre el pasaje 15, la mayoría de los queratinocitos de la población tenía el aspecto senescente según se juzgaba por la presencia de numerosas colonias abortivas que presentaban grandes células planas. Sin embargo, en el pasaje 16, eran evidentes queratinocitos que presentaban células de pequeño tamaño. La población resultante de pequeños queratinocitos que sobrevivía a este supuesto periodo de crisis se mostraba uniforme morfológicamente y producía colonias de queratinocitos que presentaban las

características típicas de un queratinocito incluyendo la adhesión célula-célula y una producción escamosa evidente. Los queratinocitos que sobrevivían a la senescencia se denominaron originalmente Línea espontánea/BC-1-Ep y se llaman ahora NIKS. La línea celular NIKS se exploró en cuanto a la presencia de secuencias de ADN provírico de VIH-1, VIH-2, EBV, CMV, HTLV-1, HTLV-2, HBV, HCV, parvovirus B-19, HPV-16, SV40, HHV-6, HHV-7, HPV-18 y HPV-31 utilizando el análisis PCR o Southern. No se detectaron ninguno de estos virus.

Se llevó a cabo un análisis cromosómico en las células parentales BC-1-Ep en el pasaje 3 y en las células NIKS en los pasajes 31 y 54. Las células parentales BC-1-Ep tenían un complemento cromosómico normal de 46, XY. En el pasaje 31, todas las células NIKS contenían 47 cromosomas con un isocromosoma adicional del brazo largo del cromosoma 8. No se detectaron otras anomalías cromosómicas o cromosomas marcadores. El cariotipo de las células NIKS se mostraba estable al menos hasta el pasaje 54.

Las huellas de ADN de la línea celular NIKS y los queratinocitos BC-1-Ep son idénticas en los doce loci analizados demostrando que las células NIKS provienen de la población parental de BC-1-Ep. Las posibilidades de la línea celular NIKS que tienen la huella de ADN de BC-1-Ep parental por oportunidad aleatoria son de 4×10^{-16} . Las huellas de tres fuentes diferentes de queratinocitos humanos, ED-1-Ep, SCC4 y SCC13y son diferentes del patrón de BC-1-Ep. Estos datos también demuestran que los queratinocitos aislados de otras ED-1-Ep, SCC4 y SCC13y humanas, no se relacionan con las células BC-1-Ep o entre ellas. Los datos de la huella de ADN de NIKS proporcionan una forma inequívoca para identificar la línea celular NIKS.

La pérdida de la función de p53 se asocia con un aumento del potencial proliferativo y un aumento de la frecuencia de inmortalidad en células cultivadas. La secuencia de p53 en las células NIKS es idéntica a las secuencias p53 publicadas (número de acceso de GenBank: M14695). En los seres humanos, el p53 existe en dos formas polimórficas predominantes que se distinguen por el aminoácido en el codón 72. Ambos alelos de p53 en las células NIKS son de tipo silvestre y tienen la secuencia CGC en el codón 72, que codifica la arginina. La otra forma común de p53 tiene una prolina en esta posición. La secuencia completa de p53 en las células NIKS es idéntica a la de las células BC-1-Ep progenitoras. Se descubrió que Rb también era de tipo silvestre en las células NIKS.

El crecimiento independiente del anclaje está correlacionado altamente con tumorigenicidad in vivo. Por esta razón, se investigaron las características de crecimiento independiente de anclaje en las células NIKS en un medio que contenía agar o metilcelulosa. Las células NIKS permanecieron como células únicas después 4 semanas en medio que contenía agar o metilcelulosa. Los ensayos continuaron durante un total de 8 semanas para detectar las variantes de crecimiento lento de las células NIKS. No se observó ninguna.

Para determinar la tumorigenicidad de los queratinocitos BC-1-Ep parentales y la línea celular NIKS de queratinocitos inmortales, se inyectaron las células en los flancos de ratones desnudos atímicos. Se utilizó la línea celular de carcinoma de células escamosas humana, SCC4, como control positivo para la producción tumoral en estos animales. La inyección de las muestras se diseñó de manera que los animales recibieron las células SCC4 en un flanco y los queratinocitos BC-1-Ep parentales o las células NIKS en el otro flanco. Esta estrategia de inyección eliminaba los animales respecto a la variación en la producción tumoral de los animales y confirmaba que los ratones mantenían un crecimiento vigoroso de las células tumorigénicas. Ni los queratinocitos BC-1-Ep parentales (pasaje 6) ni los queratinocitos NIKS (pasaje 35) producían tumores en ratones desnudos atímicos.

Las células NIKS se analizaron en cuanto a la capacidad para sufrir diferenciación tanto en cultivo sumergido como en cultivo organotípico. Las técnicas para el cultivo organotípico se describe en detalle en los ejemplos. En realizaciones particularmente preferidas, los equivalentes de piel cultivados organotípicamente de la presente invención comprenden un equivalente dérmico formado por colágeno o un material similar y fibroblastos. Los queratinocitos, por ejemplo las células NIKS o una combinación de células NIKS y células de un paciente se sembraron en el equivalente dérmico y formaron una capa epidérmica que se caracteriza por una diferenciación escamosa a continuación del procedimiento de cultivo organotípico.

Para las células en cultivo sumergido, la formación de envolturas cornificadas se controló como un marcador para la diferenciación escamosa. En queratinocitos humanos cultivados, los primeros estadios de ensamblaje de las envolturas cornificadas daban como resultado la formación de una estructura inmadura compuesta de involucrina, cistatina- α y otras proteínas, que representan el tercio interno de la envoltura cornificada madura. Menos del 2% de los queratinocitos de las células BC-1-Ep adherentes o de la línea celular NIKS producía envolturas cornificadas. Este hallazgo es consistente con los estudios previos que demostraban que los queratinocitos en crecimiento activo, subconfluentes producen menos de un 5% de envolturas cornificadas. Para determinar si la línea celular NIKS es capaz de producir envolturas cornificadas cuando se induce su diferenciación, se retiraron las células del cultivo adherente y se suspendieron durante 24 h en un medio semisólido con metilcelulosa. Muchos aspectos de la diferenciación terminal, incluyendo la expresión diferencial de queratinas y la formación de envoltura cornificada se pueden desencadenar in vitro, por pérdida de adhesión de queratinocitos célula-célula y célula-sustrato. Los queratinocitos NIKS producían la mismas y habitualmente más envolturas cornificadas que los queratinocitos parentales. Estos hallazgos demuestran que los queratinocitos NIKS no carecen de su capacidad para iniciar la formación de esta estructura de diferenciación específica del tipo celular.

Para confirmar que los queratinocitos NIKS pueden someterse a diferenciación escamosa, se cultivaron las células en un cultivo organotípico. Los cultivos de queratinocitos que se cultivaban en sustratos plásticos y se sumergían en medio se replicaban pero presentaban una diferenciación limitada. Específicamente, los queratinocitos humanos llegan a la confluencia y se someten a una estratificación limitada que produce una lámina que consiste en 3 o más capas de queratinocitos. Por microscopía óptica y electrónica hay diferencias evidentes entre la arquitectura de las láminas multicapa que se forman en el cultivo sumergido y la piel humana intacta. Por el contrario, las técnicas de cultivo organotípico permiten el crecimiento y diferenciación en condiciones como in vivo. Específicamente, las células se adhieren a un sustrato fisiológico que consiste en fibroblastos dérmicos embebidos en una base de colágeno fibrilar. El cultivo organotípico se mantiene en la interfaz de medio-aire. De esta manera, las células de las láminas superiores están expuestas al aire mientras que las células basales en proliferación se mantienen más cerca del gradiente de nutrientes proporcionados por difusión mediante el gel de colágeno. En estas condiciones, se forma la correcta arquitectura tisular. Son evidentes varias características de una epidermis diferenciada normalmente. Tanto en las células parentales como en la línea celular NIKS se encuentra una capa única de células basales cuboides que reposan en la unión de la epidermis y el equivalente dérmico. La morfología redondeada y con una relación nuclear alta respecto al citoplasma indica una población de queratinocitos que se divide activamente. En la epidermis humana normal, según se dividen las células basales dan lugar a células hijas que migran hacia arriba en capas de tejido diferenciadas. Las células hijas aumentan de tamaño y se aplanan y se convierten en escamosas. Eventualmente estas células pierden el núcleo y forman estructuras cornificadas, queratinizadas. Este proceso de diferenciación normal es evidente en las capas superiores tanto en las células parentales como en las células NIKS. La apariencia de células escamosas aplanadas es evidente en las capas epidérmicas superiores y demuestra que la estratificación se produce en los cultivos organotípicos. En la parte más externa de los cultivos organotípicos las escamas sin núcleo se descaman de la parte superior del cultivo. Hasta la fecha, no se han observado diferencias histológicas en la diferenciación a nivel de microscopía óptica entre los queratinocitos parentales y la línea celular de queratinocitos NIKS cultivados en cultivo organotípico.

Para observar características más detalladas de los cultivos organotípicos de células parentales (pasaje 5) y NIKS y para confirmar las observaciones histológicas, se analizaron las muestras utilizando microscopía electrónica. Las células parentales y la línea celular de queratinocitos NIKS humanos inmortalizados se recolectaron después de 15 días en el cultivo organotípico y se seccionaron perpendicularmente respecto a la capa basal para mostrar la extensión de la estratificación. Tanto las células parentales como la línea celular NIKS experimentaban una estratificación extensa en el cultivo organotípico y formaban estructuras que eran características de la epidermis humana normal. Se formaban abundantes desmosomas en los cultivos organotípicos de células parentales y la línea celular NIKS. También se observaba la formación de una lámina basal y los hemidesmosomas asociados en las capas basales de queratinocitos tanto de las células parentales como en la línea celular.

Los hemidesmosomas son estructuras especializadas que aumentan la adhesión de los queratinocitos a la lámina basal y ayudan a mantener la integridad y la fuerza del tejido. La presencia de estas estructuras era especialmente evidente en áreas en las que las células parentales o las células NIKS se habían unido directamente al soporte poroso. Estos hallazgos son consistentes con los hallazgos ultraestructurales anteriores utilizando queratinocitos de prepucio humano cultivados en un soporte poroso que contenía fibroblastos. El análisis tanto a nivel de microscopía óptica y microscópica demostraba que la línea celular NIKS en cultivo organotípico puede estratificarse, diferenciarse, y formar estructuras tales como los desmosomas, la lámina basal, y los hemidesmosomas que se encuentran en la epidermis humana normal.

B) Secado o irradiación de equivalentes de piel

En realizaciones preferidas, los equivalentes de piel que se producen como se describe en el Ejemplo se irradiaron y/o secaron para proporcionar un equivalente de piel no viable. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se secan para eliminar la viabilidad celular. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se irradian, por ejemplo, se irradian con radiación gamma. En algunas realizaciones los equivalentes de piel se dosifican con radiación gamma desde aproximadamente 0,5 kGy a aproximadamente 25 kGy. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se dosifican con desde aproximadamente 0,5 a aproximadamente 12 kGy de radiación, más preferentemente desde aproximadamente 1 kGy a aproximadamente 5 kGy de radiación gamma. En cualquier caso, la cantidad de radiación suministrada a los equivalentes de piel es preferentemente la suficiente para que las células contenidas en el equivalente de piel no sean viables según se ensaya por un ensayo de viabilidad MTT u otros ensayos de viabilidad apropiados. En realizaciones preferidas adicionales, los equivalentes de piel se secan al vacío o se secan por congelación. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se secan antes de la radiación. En algunas realizaciones preferidas, los equivalentes de piel se envasan en un envase estéril antes del secado o la radiación. En realizaciones preferidas adicionales, los equivalentes de piel se envasan con un material estéril tal como una gasa para permitir el almacenamiento, transporte, y la facilidad de uso para el usuario final. En otras realizaciones, los equivalentes de piel secados o radiados mantienen la capacidad para liberar polipéptidos endógenos en la superficie de una herida después de ponerlos en contacto con la herida. En realizaciones adicionales, los equivalentes de piel secados o radiados mantienen la capacidad para liberar polipéptidos exógenos en la herida después de ponerse en contacto con el ambiente de la herida. En realizaciones adicionales, los equivalentes de piel se refrigeran antes de su uso, mientras que en otras realizaciones, los equivalentes de piel se almacenan a temperatura ambiente antes de su uso.

Se reconocerá que la extensión a la que los equivalentes de piel se sequen se puede determinar comparando la peso del equivalente de piel seco con la peso de un equivalente de piel que no se ha secado (un equivalente de piel húmedo), es decir, un equivalente de piel que se acaba de retirar del cultivo organotípico. En algunas realizaciones, el equivalente de piel se seca hasta un peso final de menos del 75%, 50%, 25% o preferentemente el 15% de la del equivalente de piel húmedo. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel secos de la presente invención tienen un peso de menos del 75%, 50%, 25%, o preferentemente del 15% de la del equivalente de piel húmedo o no secado. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel secos se rehidratan antes de la aplicación a un sujeto. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel rehidratados tienen una fuerza de tensión de 0, 1 a 0,5 MPa, preferentemente desde aproximadamente 0,4 a aproximadamente 1,8 MPa. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel rehidratados tienen un valor inicial de DPM de desde aproximadamente 20 DPM a aproximadamente 300 DPM, preferentemente desde aproximadamente 70 a aproximadamente 140 DPM, y un valor de cambio de DPM de desde aproximadamente 5 DPM a aproximadamente 400 DPM, preferentemente desde aproximadamente 10 DPM a aproximadamente 220 DPM.

En algunas realizaciones, los equivalentes de piel secos y/o radiados se utilizar para suministrar un péptido o proteína de interés a un sujeto, y en algunas realizaciones preferidas al lecho de una herida de un sujeto. Los equivalentes de piel que expresan péptidos y proteínas exógenos se han descrito anteriormente por los inventores, véase, por ejemplo, el documento WO 05/012492, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se crean por ingeniería para que expresen uno o más polipéptidos antimicrobianos. En algunas realizaciones, el polipéptido antimicrobiano es catelicidina, beta-defensina humana 1, beta-defensina humana 2, o beta-defensina humana 3, o combinaciones de las mismas. En realizaciones preferidas, el péptido o el polipéptidos es exógeno, es decir, codificados y expresados por una construcción genética exógena de los queratinocitos que se utilizan para fabricar el equivalente de piel. La cantidad de péptido o polipéptido suministrado por el equivalente de piel se puede determinar aplicando una solución acuosa al equivalente de piel y midiendo la cantidad de péptido o polipéptido que se ha suministrado en la solución. En algunas realizaciones, el polipéptido se proporciona en una cantidad de desde 1 a 1000 ng de polipéptido antimicrobiano por mililitro de solución de extracción. En algunas realizaciones, el polipéptido se proporciona en una cantidad de desde 10 a 500 ng de polipéptido antimicrobiano por mililitro de solución de extracción.

C) Usos terapéuticos

Se contempla que los equivalentes de piel no viables de la presente invención se pueden utilizar terapéuticamente. En algunas realizaciones la piel seca o irradiada se utiliza en aplicaciones de tratamiento del cierre de heridas y quemaduras. El uso de autoinjertos y aloinjertos para el tratamiento de quemaduras y cierre de heridas se describe en Myers et al., A. J. Surg. 170(1):75-83 (1995) y Pat de EE. UU. N° 5.693.332; 5.658.331; y 6.039.760, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se pueden utilizar junto con sustitutos dérmicos tales como DERMAGRAFT o INTEGRA. En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para el cierre de heridas, incluyendo las heridas causadas por quemaduras, que comprende proporcionar un equivalente de piel y un paciente que padece una herida y tratar al paciente con el equivalente de piel en condiciones tales que la herida se cierre.

En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se utilizan para tratar heridas cutáneas crónicas. Las heridas cutáneas crónicas (por ejemplo, úlceras venosas, úlceras diabéticas, úlceras por presión) son un problema serio. La curación de dichas heridas a menudo conlleva más de un año de tratamiento. Las opciones de tratamiento actuales incluyen vendajes y desbridamiento (utilización de productos químicos o cirugía para retirar el tejido necrótico), y/o antibióticos en el caso de infección. Estas opciones de tratamiento necesitan periodos extensos de tiempo y mucha colaboración del paciente. Como tal, una terapia que pueda aumentar el éxito del médico en la cicatrización de heridas crónicas y acelere la velocidad de cicatrización de heridas cubriría una necesidad no satisfecha en el campo. En consecuencia, la presente invención contempla el tratamiento de heridas cutáneas con equivalentes de piel que comprenden las células de la presente invención (por ejemplo, las células NIKS). En algunas realizaciones, los equivalentes de piel se aplican por vía tópica en las heridas. En otras realizaciones, los equivalentes de piel que comprenden células NIKS se utilizan para el injerto en el espesor parcial de las heridas. En otras realizaciones, los equivalentes de piel que comprenden las células NIKS se utilizan para el injerto en el espesor completo de las heridas. En otras realizaciones, los equivalentes de piel que comprenden células NIKS se utilizan para tratar numerosos tipos de heridas internas, incluyendo, pero no limitadas a, heridas internas de las membranas mucosas que recubren el tracto gastrointestinal, colitis ulcerativa, e inflamación de membranas mucosas que puede estar producidas por las terapias contra el cáncer. En otras realizaciones más, los equivalentes de piel que comprenden células NIKS que expresan péptidos para la defensa del huésped se utilizan como un vendaje de heridas temporal o permanente.

En más realizaciones adicionales, las células se crean por ingeniería para proporcionar agentes terapéuticos adicionales al sujeto. La presente invención no se limita al suministro de un agente terapéutico en particular. Además, se contempla que se pueda suministrar una variedad de agentes terapéuticos al sujeto, incluyendo, pero sin limitarse a, enzimas, péptidos, hormonas peptídicas, otras proteínas, ARN ribosómico, ribozimas, ARN pequeño de interferencia (ARNip), micro ARN (miARN), y ARN antisentido. En realizaciones preferidas, los agentes son péptidos de defensa al huésped tales como beta-defensinas humanas 1, 2, o 3 o catelicidina, véase por ejemplo,

Solicitud de Pat. de EE.UU. 10/909.119, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Estos agentes terapéuticos pueden suministrarse para una variedad de fines, incluyendo pero no limitados al fin de corregir defectos genéticos. En algunas realizaciones preferidas en particular, el agente terapéutico se suministra con el fin de detoxicar un paciente con un error de metabolismo congénito heredado (por ejemplo, aminoacidopatías) en el que el injerto funciona como un tejido de tipo silvestre. Se contempla que el suministro del agente terapéutico corrija el defecto. En algunas realizaciones, las células se transfectan con una construcción de ADN que codifican un agente terapéutico (por ejemplo, insulina, factor IX de coagulación, eritropoyetina, etc.) y las células transfectadas se administran al sujeto. El agente terapéutico se suministra entonces en la corriente sanguínea del paciente u otros tejidos a partir del injerto. En realizaciones preferidas, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico está unido operativamente a un promotor adecuado. La presente invención no está limitada al uso de un promotor en particular. Además, se contempla el uso de una variedad de promotores, incluyendo, pero sin limitarse a, promotores inducibles, constitutivos, específicos de tejidos, y específicos de queratinocitos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se introduce directamente en los queratinocitos (es decir, por electroporación, co-precipitación en fosfato cálcico, o transfección por liposomas). En otras realizaciones preferidas, el ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se proporciona como un vector y el vector se introduce en los queratinocitos por métodos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el vector es un vector episómico tal como un plásmido replicante. En otras realizaciones, el vector se integra en el genoma de los queratinocitos. Ejemplos de vectores que se integran incluyen pero no se limitan a, vectores retrovíricos, vectores de virus adeno-asociados, vectores plásmidos no replicantes y vectores de transposón.

Experimentación

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones y aspectos preferidos de la presente invención y no se tienen que considerar como limitantes del alcance de la misma.

En la siguiente divulgación experimental, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar), mM (milimolar); μ M (micromolar); N (Normal); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); μ g (microgramos); ng (nanogramos); l (litros); ml (mililitros); μ l (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros), nm (nanómetros); °C (grados centígrados); U (unidades), mU (miliunidades); min. (minutos); seg. (segundos); % (porcentaje); kb (kilobase); pb (pares de bases); PCR (reacción en cadena de polimerasa); BSA (seroalbúmina bovina); UFC (unidades formadoras de colonias); kGy (kiloGray); PVDF (fluoruro de polivinilidina); BCA (ácido bicinchonínico); SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico de poliácridamida).

Ejemplo 1

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

Medios. El procedimiento del cultivo organotípico utiliza tres diferentes medios de cultivo, todos ellos basados en la formulación del medio SMB descrita en la Patente de EE. UU. 7.407.805, con la excepción de que se omite la toxina del cólera en todos los medios. Se utiliza el FM01 para propagar los fibroblastos dérmicos normales humanos (NHDF) para su uso en las capas equivalentes dérmicas del equivalente de piel. El FM01 tiene la misma formulación que SMB excepto en que contienen clon II de suero fetal (un 2% final) y carece de toxina del cólera. El KM01 se utiliza para cultivar los queratinocitos NIKS y tiene la misma composición que el SMB excepto que contiene un 2,5% de clon II fetal, y se añade factor de crecimiento epidérmico (EGF) adicionalmente con una concentración final de 5 ng/ml. El SM01 se utiliza durante la fase de estratificación epidérmica de la producción de equivalente de piel y es idéntico al SMB excepto por la omisión de la toxina del cólera.

Preparación del equivalente dérmico. El día 0, las células NHDF congeladas se descongelaron y se colocaron en placas. Las células se alimentaron con FM01 al día siguiente (día 1) para retirar el crioprotector residual y de nuevo el día 3. El día 4, se recolectaron para su uso en el equivalente dérmico. Para preparar el equivalente dérmico, se diluyó primero colágeno de cola de rata Tipo I a 3 mg/ml en ácido acético 0,03 N y se enfrió en hielo. Una mezcla de medio F12 de Ham (8,7x de fuerza normal y tamponado con HEPES a pH 7,5) se mezcla con el clon fetal II. Estas dos soluciones eran un 11,3 y un 9,6% del volumen de la solución final. Se añadió NaOH 1 N a la mezcla de medio (2,4% de solución final). Entonces se añadió el colágeno diluido (74,7%) a la mezcla. Se añadió a la mezcla un volumen del 2% de fibroblastos suspendidos ($2,78 \times 10^6$ /ml). Se vertieron 9 ml de la mezcla de equivalente dérmico en cada inserción de 75 mm TRANSWELL (Corning Costar). Tras un periodo de formación de gel de 50-70 minutos, las inserciones Transwell se transfirieron a la superficie de una malla de acero inoxidable en una placa de cultivo de 150 mm. Se colocaron 80 ml de FM01 en la placa de 150 mm al exterior de la inserción TRANSWELL y se colocaron 10 ml sobre el equivalente dérmico. Los equivalentes dérmicos se sitúan en una incubadora a 37 °C, un 5% de CO₂, con un 90% de humedad relativa durante 4-5 días antes de su uso en los cultivos organotípicos.

Siembra y cultivo de NIKS. Las células NIKS se descongelaron y se colocaron en placas a una densidad de aproximadamente 5×10^5 células por placa de 100 mm. El cultivo de NIKS se puede llevar a cabo en presencia o ausencia de células alimentadoras murinas. El día 1, las células NIKS se alimentaron con KM01 reciente para retirar el crioprotector residual. Las células NIKS se alimentaron de nuevo el día 3. El día 4, las células NIKS se

recolectaron de los cultivos iniciales p100 y se sembraron en matraces de cultivo de 225 cm² a una densidad de 1,2 x 10⁶ por matraz. Los cultivos de NIKS se alimentaron con medio reciente los días 7 y 8. El día 9, las células NIKS se recolectaron, se recontaron, y se re-suspendieron en SM01. Se sembraron 2,27 x 10⁴ células NIKS/cm² en la superficie de los equivalentes dérmicos. Las placas son cultivos que se alimentan y se elevan a la interfaz aire-medio. Los cultivos se transfirieron a una incubadora de humedad controlada fijada al 75% en donde permanecieron durante el resto del crecimiento. Los cultivos se alimentaron con SM01 los días 14, 18, 22, 25, 28, y 30.

Ejemplo 2

10 **Determinación de la dosis de radiación gamma necesaria para producir tejido equivalente de piel no viable estéril.**

El calendario de producción para desarrollar equivalentes de piel radiados se basaba en un procedimiento de producción de 28 días establecido previamente para los productos de tejidos cutáneos humanos creados por ingeniería. Los tejidos 9F1 y 2D2, que se habían creado por ingeniería para el aumento de la expresión de los péptidos de defensa al huésped hBD-3 y hCAP18/LL-37, respectivamente, se produjeron utilizando procedimientos asépticos. Los tejidos se transformaron en cámaras de gel nutriente y se sellaron antes del envasado y transporte. Se llevó a cabo la radiación en Sterigenics, Inc., utilizando el irradiador gamma de alta precisión ExCell, en sus instalaciones de Charlotte, North Carolina. Los tejidos recibieron una de cinco dosis de radiación: 0 kGy, 1 kGy, 5 kGy, 8 kGy, u 11 kGy. Estas dosis se escogieron basándose en la evaluación previa de dosis similares en tejidos de aloinjertos. Tras la irradiación los tejidos se refrigeraron antes del análisis en los tiempos indicados posteriormente.

Al devolver las muestras procesadas a Stratatech, se descubrió que algunos de los tejidos almacenados en geles nutrientes se desenganchaban de sus membranas de soporte subyacentes, dando como resultado el plegamiento y arrugamiento de los tejidos. Este fenómeno se observó en tejidos radiados y no radiados. Se desarrollaron posteriormente procedimientos de transporte que resolvieran este problema. Véase los Ejemplos posteriores.

Ensayo de esterilidad: Se obtuvieron biopsias con troquel a partir de tejidos 9F1 y 2D2 que se habían sometido a radiación gamma a dosis que variaban desde 0 a 11 kGy. Las muestras de los tejidos almacenadas durante 3 días tras la irradiación se inocularon en caldo de soja tripticasa o medio fluido con tioglicolato. Los cultivos se incubaron durante 14 días en las condiciones definidas en cuanto al ensayo de esterilidad por la Farmacopea de EE. UU. Tras 14 días, los cultivos se examinaron visualmente en cuanto a crecimiento microbiano. No se observó ningún crecimiento microbiano en ninguno de los tejidos analizados, demostrando que los tejidos se mantenían estériles a lo largo de la manipulación, irradiación, y transporte.

Ensayo de viabilidad por el ensayo de viabilidad MTT: Se obtuvieron biopsias de los tejidos 9F1 y 2D2 irradiados con radiación gamma y de control a los 3 días, 7 días, o 14 días tras el tratamiento de radiación y se midió la viabilidad celular por el ensayo de viabilidad MTT. En resumen, el sustrato MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-3-il)-2,5-difenil tetrazolio, se convierte en el producto MTT formazan por las deshidrogenasas de las células viables. El producto coloreado se extrae entonces en isopropanol y se lee a 550 nm. Se midió la viabilidad den cuarto lotes de tejido independientes, y los resultados representativos se muestran en la Figura 1. La viabilidad de los tejidos no radiados no cambiaba significativamente durante el periodo de almacenamiento. Los tejidos tratados con 1 kGy de radiación tenían una actividad enzimática residual a los 3 días tras la irradiación que continuaba disminuyendo a los 7 y 14 días tras la radiación. Sin embargo, los tejidos tratados con dosis de 5, 8, u 11 kGy presentaban una mínima actividad residual en todos los puntos de tiempo y permanecía baja a lo largo del curso del periodo de 14 días de almacenamiento. A los 14 días tras la radiación, la actividad metabólica de tejidos irradiados con 1 kGy se redujo al mismo nivel bajo que se veía en las dosis de radiación más altas.

Determinación de la viabilidad por el ensayo de migración de queratinocitos: Se establecieron cultivos de explantes de biopsia a partir de tejidos de control o tejidos irradiados para determinar si los queratinocitos se inactivaban por los tratamientos con radiación. Las biopsias con troquel obtenidas de los tejidos 3 días tras la irradiación se transfirieron a un medio de cultivo, se cultivaron durante 48 horas y se procesaron para la tinción histológica utilizando hematoxilina/eosina y la microscopía digital. Se obtuvieron imágenes para evaluar la arquitectura tisular y valorar como positivas o negativas en cuanto a la migración de queratinocitos desde los extremos de la herida creada por los troqueles de biopsia de acuerdo con el esquema de la Figura 2. La migración era evidente en los tejidos 9F1 y 2D2 no radiados pero estaba ausente en todos los tejidos sometidos a radiación gamma.

Ensayo de extensión de fibroblastos: Se obtuvieron biopsias a partir de tejidos de control e irradiados a los 7 días tras la radiación, y se trataron con colagenasa bacteriana para liberar los fibroblastos. Las células liberadas de estos tejidos se transfirieron a placas de cultivo, permitiéndolos que crecieran durante seis días en medio de cultivo, y se visualizaron por tinción con azul de metileno. La extensión celular de fibroblastos se valoró como positiva o negativa basándose en la presencia o ausencia de células teñidas de azul, respectivamente. Las imágenes de los cultivos de fibroblastos aislados de los tejidos no radiados o radiados se muestran en la Figura 3. La extensión de fibroblastos se observó en los cultivos de control que no recibieron radiación, pero estaba ausente en las preparaciones derivadas de tejidos irradiados.

A partir de los estudios anteriores, se determinó que la esterilidad del producto se mantenía a lo largo de la producción y procesamiento de los tejidos. El tratamiento de los tejidos equivalentes de piel con dosis de radiación de 1 kGy daba lugar a tejido no viable utilizando dos ensayos independientes de viabilidad. La dosis de 5 kGy o mayores daban como resultado tejidos no viables como se evaluaba con los tres métodos.

5

Ejemplo 3

Evaluación de las propiedades estructurales de tejido equivalente de piel irradiado con radiación gamma

Las propiedades estructurales de los tejidos irradiados tras 3 días de almacenamiento en refrigeración se evaluaron por tinción histológica con hematoxilina y eosina y se visualizaron por microscopía óptica. La tinción histológica verificaba que los tejidos irradiados mantenían una organización tisular normal y morfología macroscópica. Todas las capas celulares, incluyendo la dermis, capas de queratinocitos basal y espinosa, y el estrato córneo, eran identificables en los tejidos de control no radiados y los irradiados, aunque era aparente algún daño tisular con las dosis de radiación más altas, que se visualizaban como huecos entre los compartimentos dérmico y epidérmico. Como resultado, los niveles de dosis de 1 kGy y 5 kGy se identificaron como las más prometedoras para su uso en estudios posteriores.

20

Ejemplo 4

Evaluación de las propiedades bioquímicas, incluyendo la actividad antimicrobiana in vitro, de tejido equivalente de piel irradiado con radiación gamma

La radiación gamma estimula el daño dependiente de la dosis a las proteínas tanto directa como indirectamente. El daño directo ese inicia mediante ionización, mientras que el daño indirecto implica la hidrólisis de las moléculas de agua y la modificación o entrecruzamiento oxidativo de macromoléculas. Como resultado, la proteína del tejido puede presentar un aumento de degradación y disminución de la solubilidad al irradiarse. Como se espera que el producto en desarrollo funcione por medio de la provisión de niveles elevados de péptidos de defensa al huésped, era necesario determinar la accesibilidad y actividad biológica de las proteínas tras la radiación. El análisis de tejidos irradiados incluía el análisis de proteína total y soluble, análisis de inmunotransferencia, y ensayos de actividad antimicrobiana.

Análisis de proteína total y soluble: Se obtuvieron biopsias con troquel de tejidos de piel 2D2 y 9F1 radiados y no radiados y se sumergieron en 0,2 ml de agua estéril. Las muestras de biopsia se incubaron a 37 °C durante 72 h para extraer la proteína, se recolectaron los sobrenadantes, y se cuantificó la proteína total por un ensayo BCA. Como se muestra en la Figura 4, la proteína total eluída en el sobrenadante disminuía con el aumento de la dosis de radiación. Estos resultados eran consistentes con el daño de proteínas que se ha informado ampliamente mediado por la radiación por entrecruzamiento, una modificación que reduce la solubilidad proteica. Sin embargo, en estudios preliminares que utilizaban tejidos envasados en un ambiente menos hidratados que consistían en una venda no adherente, se eliminaba esta disminución de la extracción proteica dependiente de la dosis (véase el Ejemplo 6).

Análisis de péptidos: La extracción proteica puede reflejar el estado bioquímico general de tejidos procesados; otros parámetros relevantes que apoyan el desarrollo de un vendaje de heridas antimicrobiano son la integridad y solubilidad de los péptidos antimicrobianos. Para evaluar estos parámetros, se llevó a cabo un análisis de inmunotransferencia sobre las proteínas extraídas de tejidos 2D2 radiados y no radiados. Se obtuvieron biopsias con troquel de tejidos 2D2 y se transfirieron en medio de cultivo libre de suero durante 48 horas adicionales. El medio acondicionado de tejidos por duplicado se recolectaron, se re-disolvieron las proteínas por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF, y se procesaron para el análisis de inmunotransferencia utilizando métodos convencionales. Los péptidos antimicrobianos se detectaron utilizando anticuerpos específicos de hCAP-18, que detectan la proteína antimicrobiana hCAP18 humana intacta y su fragmento proteolítico bioactivo, LL-37. Tanto la hCAP18 intacta como LL37 se detectaron fácilmente en los medios acondicionados por los tejidos, independientemente de la dosis de radiación, y el patrón de migración de estas proteínas en la SDS-PAGE tampoco estaba afectada por las dosis de radiación utilizados en estos estudios. Había ligeros aumentos de péptidos liberados de los tejidos de control no radiados. Estos ligeros aumentos pueden ser debidos a la nueva síntesis y secreción de péptidos del tejido viable, o como resultado del aumento de la solubilidad del péptido en estos tejidos.

Ensayo de actividad antimicrobiana: Habiendo establecido la integridad de los péptidos antimicrobianos liberados de los tejidos radiados y no radiados, los inventores evaluaron los tejidos de control e irradiados en cuanto a las propiedades antimicrobianas. En resumen, se obtuvieron biopsias con troquel de tejidos radiados y no radiados, y se transfirieron a un medio de cultivo libre de suero durante 2, 4, o 24 h para permitir la extracción de péptidos antimicrobianos. Los medios se recolectaron y se combinaron con un inóculo de $1,0 \times 10^5$ UFC de *S. carnosus* en un medio de crecimiento bacteriano. Esta mezcla se incubó a 37 °C con agitado continuo durante 60 min. A continuación, las muestras se colocaron en placas en placas bacteriológicas utilizando un WASP2 Spiral Plater (Microbiology International, Frederick, MD) y se incubaron durante 16 h a 37 °C. Se hizo el recuento de las colonias, y se determinó la densidad bacteriana viable, expresada en UFC/ml. Los valores se normalizaron frente a la densidad de cultivos bacterianos que crecen en presencia de medio de cultivo libre de suero sin extractos tisulares.

65

Como se muestra en la Figura 5, las muestras extraídas de los tejidos 2D2 se trataron con 1 kGy de radiación presentaban un aumento de la actividad antimicrobiana según indicaba la disminución de la densidad bacteriana con respecto a los tejidos no radiados en los periodos de acondicionamiento de 2 y 4 horas. Este aumento transitorio no se observaba en tejidos tratados con una dosis de 5 kGy, ni era evidente en tiempos de acondicionamiento más largos. Un aumento similar de la actividad se veía en tejidos 9F1 que se habían irradiado a 1 kGy (datos no mostrados). Esta actividad antimicrobiana mejorada es sorprendente ya que los ejidos irradiados pueden liberar menos cantidad de proteína total y de péptidos de catelicidina antimicrobianos durante periodos de tiempo más largos. Sin embargo, mientras que los estudios anteriores utilizaban tejidos que se incubaban durante al menos 48 h, la mejoría de la actividad antimicrobiana se observaba solo en las muestras extraídas de los tejidos irradiados durante 2 o 4 horas.

En total, el análisis bioquímico de equivalentes de piel irradiados reveló que el nivel total de proteína soluble estaba disminuido, pero la integridad del péptido antimicrobiano estaba muy conservada. Los péptidos extraídos de los tejidos equivalentes de piel irradiados a 1 kGy demostraron que reducían el crecimiento bacteriano hasta un 80% con respecto a los cultivos bacterianos de control. Estos resultados demostraban la fiabilidad del mantenimiento de la actividad biológica en estos tejidos de piel creados por ingeniería procesados terminalmente.

Ejemplo 5

Almacenamiento de tejidos equivalentes de piel irradiados

Se llevó a cabo un análisis de la capacidad de almacenamiento a corto plazo de tejidos 9F1 y 2D2 irradiados almacenados en geles nutrientes. En estos estudios, se analizaron los tejidos irradiados refrigerados a los 7 días y los 37 días tras el tratamiento, y se evaluaron o ensayaron en cuanto a la arquitectura tisular y las actividades de los péptidos antimicrobianos. La organización total del tejido de los tejidos irradiados estaba preservada durante los 37 días de almacenamiento refrigerado. A los niveles de dosis examinados, los tejidos refrigerados mantenían ambos compartimentos dérmico y epidérmico. En el compartimento epidérmico, se mantenía la distinción entre las capas de queratinocitos basales y espinosos, y las capas cornificadas permaneció sin cambios. El daño celular mínimo en el tejido se manifestaba como espacios intercelulares entre los queratinocitos en las capas basal y suprabasal, y el almacenamiento de tejidos daba como resultado una separación parcial entre los compartimentos dérmico y epidérmico. Sin embargo, esto se veía en los tejidos en todos los periodos de tiempo examinados.

Actividad de los péptidos antimicrobianos: Las muestras se obtuvieron a partir de tejidos 9F1 y 2D2 radiados y no radiados que se habían almacenado a temperaturas de refrigeración durante 7 días o 37 días tras la irradiación. Los ensayos de actividad antimicrobiana se llevaron a cabo como anteriormente. Se determinó la densidad bacteriana (UFC/ml) y se normalizaron los datos respecto al crecimiento de cultivos bacterianos cultivados en presencia de medio de crecimiento reciente libre de suero. Los resultados de estos estudios se muestran en las Figuras 6 y 7 para los tejidos 9F1 y 2D2, respectivamente. Los tejidos 9F1, irradiados con una radiación de 1 kGy y almacenados durante 7 días, presentaban un 86% de reducción del crecimiento bacteriano con respecto a los cultivos bacterianos de control. En comparación, los tejidos 9F1 no radiados daban como resultado un 52% de reducción del crecimiento bacteriano. De manera similar, los tejidos 2D2 irradiados con 1 kGy refrigerados durante 7 días daban como resultado un 72% de reducción del crecimiento bacteriano, en comparación con un 57% de reducción producida por los tejidos 2D2 no radiados. Las actividades antimicrobianas de los tejidos 9F1 y 2D2 irradiados con 1 kGy volvían a aproximadamente las de los tejidos no radiados a los 27 días de almacenamiento en refrigeración, pero seguían presentando actividad antimicrobiana frente a los cultivos de control. Aunque todos los tejidos tratados con 5 kGy mantenían una actividad antimicrobiana medible a los 7 días de almacenamiento tras la irradiación, esta actividad se reducía en el almacenamiento prolongado. Estos datos sugieren que los tejidos irradiados pueden proporcionar una actividad antimicrobiana que es detectable después de más de un mes de almacenamiento en refrigeración.

Ejemplo 6

Efectos de la configuración del envasado

Se observó que los tejidos que se habían procesado en el Ejemplo 2, anteriormente, se despegaban de la membrana del soporte subyacente, dando como resultado el plegamiento y arrugamiento de los tejidos. Para evitar este fenómeno, se desarrolló una configuración de envasado que evitaba este movimiento del tejido. En esta configuración modificada, los tejidos se retiraban de sus inserciones y se transferían a una gasa no adherente estéril, y se sellaban en bolsas de plástico estériles. Tras retirarlos de la bolsa de plástico, los tejidos no presentaban pruebas de arrugamiento o plegamientos.

Los efectos de la radiación gamma en las proteínas se ha descrito en otro sitio, y estos efectos están mediados en gran parte por radicales libres y especies de oxígeno reactivo generados por la hidrólisis de las moléculas de agua en la muestra. Debido al alto contenido de humedad en las cámaras de gel nutriente que se utiliza para el transporte de los productos de tejido creados por ingeniería, se anticipaba que los tejidos radiados envasados en cámaras de gel nutriente o gasa no adherente seca durante el tratamiento de irradiación presentarían diferentes propiedades

bioquímicas. Se obtuvieron biopsias con troquel de tejidos 2D2 y 9F1 radiados y no radiados y se sumergieron en 0,2 ml de agua estéril. Se incubaron las biopsias a 37 °C durante 24 h, se recolectaron los sobrenadantes, y las proteínas eluidas se cuantificaron por el ensayo BCA. Como se muestra en la Figura 8, la proteína hidrosoluble total disminuía según aumentaba la dosis de radiación en los tejidos envasados en cámaras de gel nutriente, los que coincidía con los estudios descritos anteriormente. Por el contrario, el envasado de tejidos irradiados en gasa no adherente restauraba la accesibilidad de las proteínas a aproximadamente la de los niveles del control. El envasado de tejidos en gasa antes de la radiación puede reducir por lo tanto el nivel de daño proteico en el tejido irradiado presentando un ambiente que menos permisivo al entrecruzamiento proteico.

Ejemplo 7

Secado por congelación de equivalentes de piel creados por ingeniería

Los equivalentes de piel creados por ingeniería se fabricaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Al completarlos, las inserciones TRANSWELL que contenían los equivalentes de piel se transfirieron asépticamente a placas TRANSWELL de plástico, se cubrieron, y se colocaron en un estante del VIRTIS Genesis Freeze Dryer (Gardiner, NY) y se mantuvo a 20 °C. Los tejidos se congelaron reduciendo la temperatura de 20 °C a -20 °C a una velocidad de -1,33 °C por minuto a una presión de 2100 mT; y desde -20 °C a -60 °C a una velocidad de -0,67 °C por minuto a una presión de 2100 mT. Se aplicó vacío para reducir la presión a 0 mT, y se calentaron los tejidos desde -60 °C a 20 °C a +0,25 °C por minuto. Se completó el secado manteniendo las muestras a 0 mT durante al menos 16 horas.

Ejemplo 8

Secado al vacío de equivalentes de piel creados por ingeniería

Los equivalentes de piel creados por ingeniería se fabricaron como se ha descrito en el Ejemplo 1. Las inserciones TRANSWELL que contenían los equivalentes de piel se transfirieron asépticamente a placas TRANSWELL de plástico, se cubrieron y se depositaron en un estante de una cámara del VIRTIS Genesis Freeze Dryer mantenida a 25 °C. La presión de la cámara se redujo a intervalos de ocho minutos de la siguiente manera: 900 mT, 830 mT, 760 mT, 690 mT, 620 mT, 550 mT, 490 mT, 430 mT, 370 mT, 310 mT, 250 mT, 200 mT, 150 mT, 100 mT, 50 mT, 25 mT. Las muestras se mantuvieron a 25 mT durante al menos 16 horas hasta completar el secado.

Ejemplo 9

Peso seco de los equivalentes de piel creados por ingeniería

Los equivalentes de piel creados por ingeniería se fabricaron y se obtuvieron los pesos de tejido húmedo antes y después del secado por congelación. Los pesos de tejido obtenidos tras el secado por congelación variaban desde un 11,7% a un 13,7% del peso de tejido húmedo original. (Tabla 1).

Tabla 1. Medición del peso seco de los equivalentes de piel creados por ingeniería

I.D. del tejido	Peso húmedo (mg)	Peso seco (mg)	% del peso húmedo
050508-1	1330,2	156,0	11,7
050508-2	1035,5	122,4	11,8
050508-3	1204,4	165,2	13,7

Ejemplo 10

Irradiación de equivalentes de piel creados por ingeniería secos

Los tejidos equivalentes de piel creados por ingeniería para que sobre-expresaran péptidos de defensa al huésped hCAP18/LL-37 se fabricaron como se describe en el Ejemplo 1, y se secaron como se ha descrito en los Ejemplos 7 y 8. Tras el secado, los tejidos se retiraron de las inserciones TRANSWELL y se sellaron por calor en bolsas de plástico estériles. Los tejidos se irradiaron en Sterigenics como se ha descrito en el Ejemplo 2, a los niveles de dosis de 1, 5, o 25 kGy, seguido por el almacenamiento de los tejidos a temperatura ambiente durante los dos meses. Se evaluó la arquitectura tisular total por tinción de secciones histológicas con hematoxilina y eosina. La viabilidad tisular se evaluó por un ensayo MTT como se ha descrito en el Ejemplo 2. La función de barrera tisular se evaluó en los tejidos irradiados secos utilizando mediciones métricas de impedancia. Los especímenes obtenidos de tejidos irradiados secos se estiraron hasta el fallo bajo tensión uniaxial y se determinaron las propiedades mecánicas. Los niveles de péptido antimicrobiano se cuantificaron por ELISA de los extractos solubles que se obtuvieron de los tejidos irradiados secos.

Análisis histológico: Se obtuvieron las biopsias de tejidos recientes, o de tejidos que se habían secado por congelación o secados al vacío a temperatura ambiente y posteriormente se irradiaron a uno de los tres niveles de

dosis y se almacenaron a temperatura ambiente durante hasta dos meses. Los especímenes se procesaron para la tinción histológica utilizando hematoxilina/eosina con el fin de visualizar la arquitectura tisular, y se obtuvieron micrografías con una magnificación de 400x. Las imágenes representativas de los tejidos irradiados secados por congelación y secados al vacío se muestran en la Figura 9 y la Figura 10, respectivamente. Los especímenes recién preparados presentaban la arquitectura tisular esperada para los tejidos sustitutos de piel creados por ingeniería (Figuras 9 y 10, panel 1).

Los tejidos equivalentes de piel secados por congelación sometidos a radiación mantenían una arquitectura tisular macroscópica normal, con componentes dérmicos y epidérmicos reconocibles (Figura 9). El compartimento dérmico presenta cambios estructurales, que incluyen la compactación y la deslaminación del compartimento epidérmico. En el compartimento epidérmico, la organización de las capas basal, espinosa y del estrato córneo estaban muy conservadas.

Los tejidos equivalentes de piel creados por ingeniería secados al vacío sometidos a radiación mantienen la estructura tisular normal macroscópica, con componentes dérmicos y epidérmicos reconocibles (Figura 10); incluyendo las capas de queratinocitos reconocibles de dermis, basal y espinosa, y el estrato córneo. Sin embargo, la compactación de los compartimentos dérmicos es evidente, dando como resultado un tejido que es más delgado que los tejidos sin conservar. El aumento de la dosis de radiación no introducía cambios adicionales en la histología total de los tejidos secados al vacío.

Ensayo de viabilidad por ensayo de viabilidad MTT: Se recolectaron biopsias con troquel (de 8 mm de diámetro) a partir de tejidos recientes o de tejidos que se habían secado por congelación o secado al vacío a temperatura ambiente y se radiaron a una de las tres dosis. Las biopsias se procesaron, y se cuantificó la actividad metabólica midiendo la absorbancia de las muestras a 550 nm utilizando un TECAN GENios plate reader (TECAN US, Durham, NC). La actividad metabólica se normalizó respecto a los tejidos de control recién preparados. Como se muestra en la Figura 11, se redujo la actividad metabólica hasta un 90% utilizando una combinación de secado y radiación. Lo que coincide con la reducción observada previamente en la actividad metabólica que se observaba en los tejidos irradiados (Ejemplo 2).

Análisis de la función de barrera del tejido: La función de barrera se llevó a cabo en especímenes con forma de hueso de perro ASTM que se cortaron de los tejidos de piel creados por ingeniería que estaban secados al vacío o por congelación y expuestos a una de las tres dosis de radiación (1, 5, o 25 kGy). Los especímenes se recolectaron con un troquel y se envasaron individualmente antes del almacenamiento o la irradiación.

Los especímenes con forma de hueso de perro se retiraron de su envase, se rehidrataron, y se ensayaron en cuanto a su función de barrera. En resumen, los especímenes se coloraron con la parte epidérmica en las inserciones TRANSWELL, colocadas en placas con 10 ml de medio y se permitió que se rehidrataran (a partir del fondo hacia arriba) durante 1 h a temperatura ambiente. Las inserciones TRANSWELL se transfirieron a papeles de filtro humedecidos y se dejó que se equilibraran durante 45 min. La función de barrera epidérmica en las regiones de enganche de cada espécimen se cuantificaba midiendo la capacitancia eléctrica de superficie de las superficie del tejido con un medidor NOVA Dermaphase (NOVA Technology Corp, Portsmouth, NH), que se utiliza clínicamente para evaluar la función de barrera epidérmica. Los cambios en las mediciones de impedancia durante un periodo de medición de 10 segundos reflejan los cambios en el estado de hidratación de la superficie del tejido. Debido a que el aumento de hidratación resulta del pasaje de agua a través del estrato córneo, la magnitud del cambio refleja la integridad de la permeabilidad de la barrera epidérmica. Basándose en los datos de la función de barrera recolectados de más de 80 lotes del tejido de StrataGraft®, las lecturas iniciales de < 294 DPM y los cambios de menos de 658 DPM unidades se consideraban como una función de barrera aceptable.

Como se muestra en la Figura 12, el cambio de la impedancia eléctrica de la superficie del tejido y las lecturas de DPM iniciales eran similares para los tejidos secados irradiados y para los tejidos de piel creados por ingeniería preparados recientemente. Tanto los tejidos preparados recientemente como los secados irradiados conseguían una función de barrera epidérmica que se consideraba aceptable de acuerdo con los datos históricos recopilados en el tejido de piel StrataGraft®. Basándose en estos resultados, se anticipaba que la radiación del tejido de piel creado por ingeniería no producía efectos adversos sobre la función de barrera el producto resultante.

Análisis de la fuerza de tensión – Después del ensayo de barrera epidérmica, cada espécimen se sumergió en 10 ml de PBS y se permitió que se rehidrata durante al menos 1 hora adicional. A continuación de la rehidratación, se midió el espesor del espécimen en la región medible utilizando un calibre de grosor Mitutoyo. Se tiró entonces de los especímenes extensibles hasta la rotura por tensión uniaxial con una tasa el 100%/min (25 mm/min), con la hidratación del espécimen mantenida por recirculación de PBS. Los datos de carga y desplazamiento de cada experimento se exportaron a Microsoft Excel para el análisis y recopilación de datos. Los datos de estos análisis se presentan en la Figura 13.

El secado y radiación de los equivalentes de piel creados por ingeniería daba como resultado efectos variables en las propiedades mecánicas de los tejidos. El análisis de los resultados del ensayo mecánico era complicado por la alta variabilidad entre los especímenes de tejido, sin embargo se observaban algunas fuertes tendencias. Los tejidos

secados, independientemente del método de secado o dosis de irradiación, son incapaces de volver a tener su espesor completo de antes del secado tras la re-hidratación, lo que resulta en especímenes significativamente más finos en comparación con los controles recientes. En cuanto a la histología, esta reducción parece que ocurre principalmente en la capa dérmica, manteniéndose el espesor epidérmico relativamente constante. También hay una fuerte tendencia en el secado a dar como resultado un tejido más rígido y quebradizo, añadiendo la irradiación a este efecto. Esto se puede ver por el incremento del módulo inicial, así como por la reducción del alargamiento hasta la ruptura. Aunque algunos de los valores en los módulos se pueden atribuir a la reducción de grosor (aumento de la tensión medida para un determinado aumento de la carga), las diferencias de grosor no se tienen en cuenta completamente para diferenciar los grupos.

El grado de variabilidad en los resultados hace difícil discernir los efectos adicionales con certeza estadística. La fuerza de tensión media no parecía estar afectada adversamente por el secado o la irradiación hasta 25 kGy; sin embargo la irradiación pudo haber causado un ligero, pero insignificante estadísticamente, descenso en el pico de carga.

Análisis del péptido antimicrobiano: Los péptidos derivados de hCAP18 de los equivalentes de piel creados por ingeniería se cuantificaron utilizando una kit de detección ELISA disponible en el mercado. Los extractos solubles se prepararon aplicando tópicamente medio de cultivo libre de suero en la superficie de los tejidos recientes o conservados (0,16 ml de medio libre de suero por cm²), y equilibrando los tejidos durante 2 h a 37 °C. Los extractos se utilizaron en un ELISA que detecta la proteína hCAP18 intacta y los metabolitos LL37 procesados post-traduccionalmente. Las muestras se cuantificaron con respecto a una curva de referencia de péptido LL37 y los niveles de proteína hCAP18 se expresaron como ng de proteína por ml de extracto tisular.

Como se muestra en la Tabla 2, los tejidos secados por congelación y secados al vacío presentaban niveles de péptido derivado de hCAP18 extraíbles mayores del 75% de los que se obtenían de los tejidos de piel creados por ingeniería preparados recientemente.

Tabla 2. Cuantificación de Péptidos derivados de hCAP18 en equivalentes de piel creados por ingeniería irradiados secos. Los valores se presentan como la media de concentración $\pm$ la desviación estándar de la proteína inmunorreactiva en extractos de tejidos de dos tejidos independientes.

Grupo de Tratamiento	Proteína hCAP18 (ng/ml)
EG111008 Reciente	97,4 $\pm$ 14
EG111008 Secado por congelación 0 kGy	73,1 $\pm$ 4,8
EG111008 Secado por congelación 1 kGy	183 $\pm$ 4,8
EG111008 Secado por congelación 5 kGy	179 $\pm$ 2,0
EG111008 Secado por congelación 25 kGy	120 $\pm$ 3,2
EG111008 Secado al vacío 0 kGy	122 $\pm$ 10
EG111008 Secado al vacío 1 kGy	120 $\pm$ 15
EG111008 Secado al vacío 5 kGy	77,7 $\pm$ 3,4
EG111008 Secado al vacío 25 kGy	66,8 $\pm$ 7,0

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan en el presente documento por referencia. Serán evidentes distintas modificaciones y variaciones del método descrito y sistema de la invención para los expertos en la técnica sin alejarse del alcance y espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones preferidas específicas, se debería entender que la invención reivindicada no se debería limitar indebidamente a dichas realizaciones específicas. Además, se tiene la intención de que distintas modificaciones de los modos descritos de llevar a cabo la invención que sean obvias para los expertos en cultivos tisulares, biología molecular, bioquímica, o campos relacionados estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para conservar un equivalente de piel cultivado organotípicamente para su uso como un vendaje de heridas que comprende:
5 proporcionar dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente que comprende células NIKS y un envase; tratar dicho equivalente de piel con radiación a una dosis de 5 kGy a 25 kGy de radiación gamma y secarlo para eliminar la viabilidad celular en el equivalente de piel; y
10 envasar dicho equivalente de piel para proporcionar un equivalente de piel envasado.
2. El método de la Reivindicación 1, donde dicha etapa de tratamiento comprende la irradiación de dicho equivalente de piel de manera que dicho equivalente de piel se vuelve estéril y no viable.
3. El método de la Reivindicación 1, donde dicha etapa de tratamiento comprende el secado de dicho equivalente de piel en condiciones tales que las células de dicho equivalente de piel se vuelven no viables, donde dicho equivalente de piel se seca hasta un peso final de menos del 50% de un equivalente de piel húmedo.
4. El método de la Reivindicación 1, donde dicho tratamiento comprende el secado de dicho equivalente de piel en condiciones tales que las células que producen dicho equivalente de piel se vuelven no viables e irradiando dicho
20 equivalente de piel en condiciones tales que el equivalente de piel se vuelve estéril.
5. El método de la Reivindicación 1, donde dichas células NIKS comprenden una secuencia de ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido antimicrobiano.
- 25 6. El método de la Reivindicación 3, donde dicho equivalente de piel, tras la rehidratación, tiene un valor inicial de DPM de desde 20 a 300, y un valor de cambio de DPM de desde 5 a 400 y una fuerza de tensión de desde 0,1 a 5,0 MPa.
7. Un equivalente de piel humana envasado producido por el método de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6.
8. Una composición que comprende un equivalente de piel humana, no viable, aislado in vitro como se desvela en la reivindicación 7, donde dicho equivalente de piel comprende células NIKS y tiene un peso de menos del 50% del peso de un equivalente de piel húmedo.
- 35 9. La composición de la Reivindicación 8, donde dichas células NIKS comprenden una secuencia de ácido nucleico exógeno que codifica un polipéptido exógeno.
10. La composición de la Reivindicación 9, donde dicho polipéptido exógeno es un polipéptido antimicrobiano.
- 40 11. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 10, donde dicho equivalente de piel, tras la rehidratación, tiene un valor inicial de DPM de desde 20 a 300, y un valor de cambio de DPM de desde 5 a 400 y una fuerza de tensión de desde 0,1 a 5,0 MPa.
- 45 12. La composición de cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 11 para su uso en el tratamiento de un sujeto.
13. La composición de la Reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de una herida.
- 50 14. La composición de la Reivindicación 13, donde dicho equivalente de piel se utiliza para tratar dicha herida temporalmente.

FIGURA 1

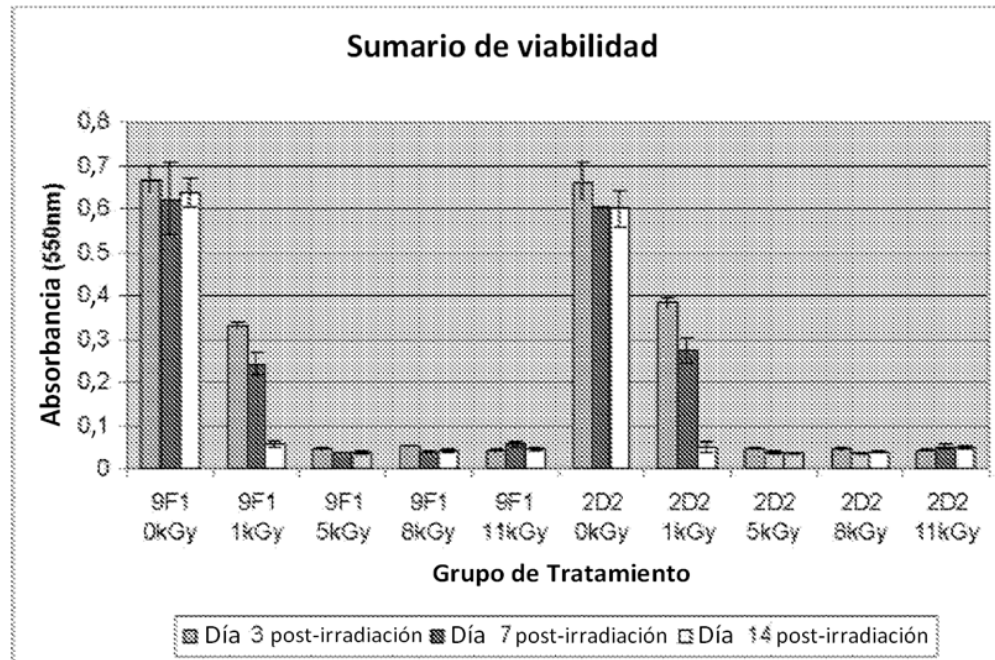


FIGURA 2

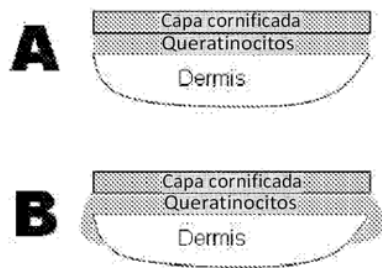


FIGURA 3

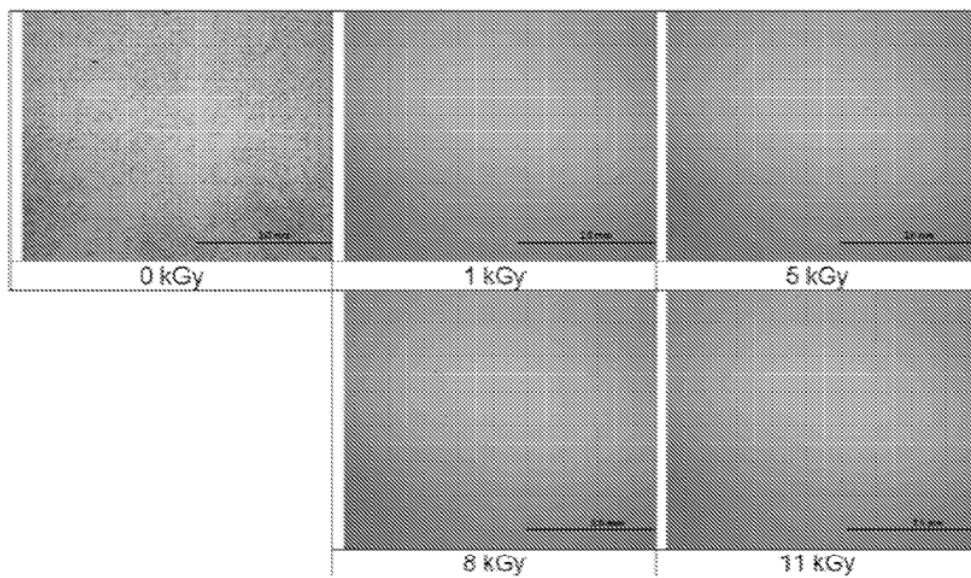


FIGURA 4

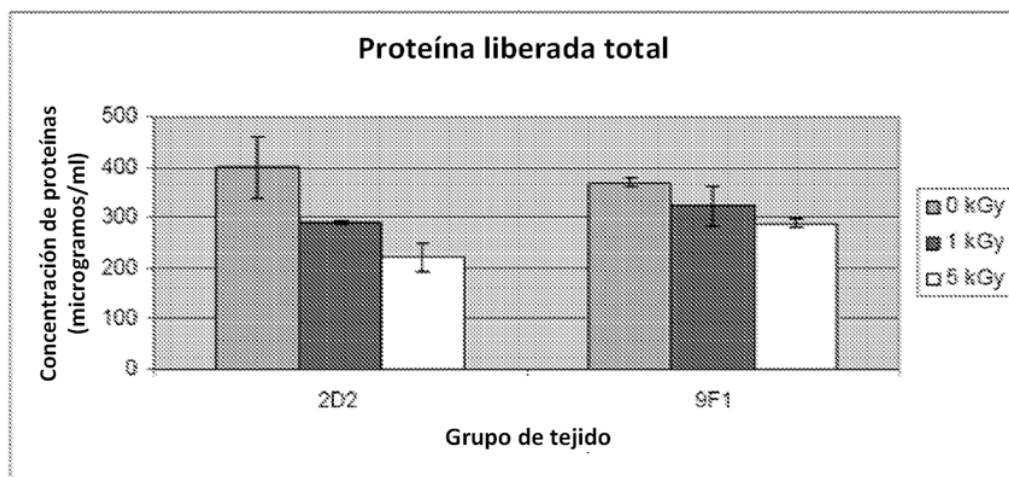


FIGURA 5

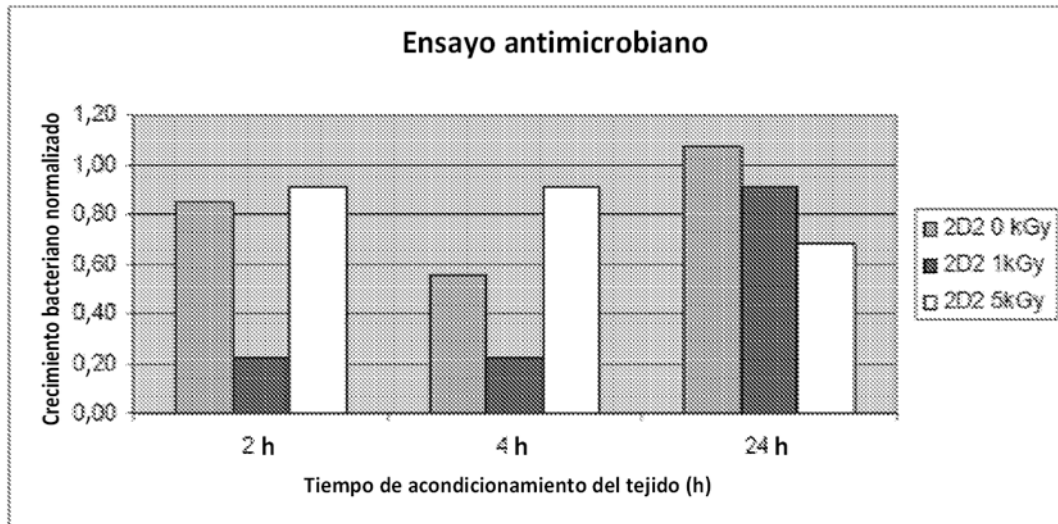


FIGURA 6

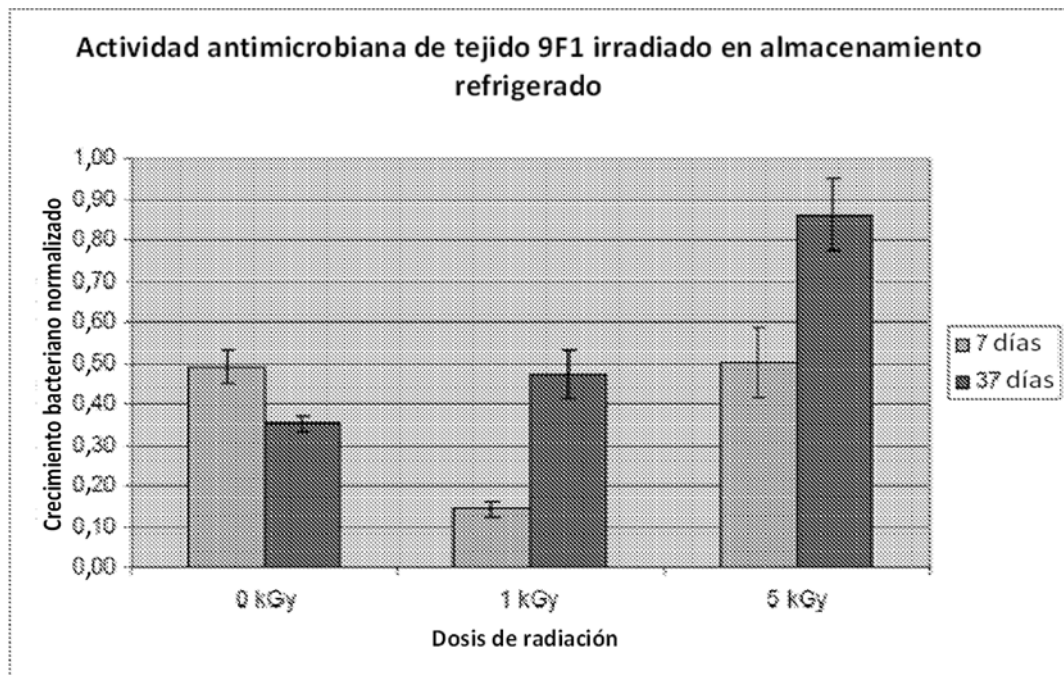


FIGURA 7

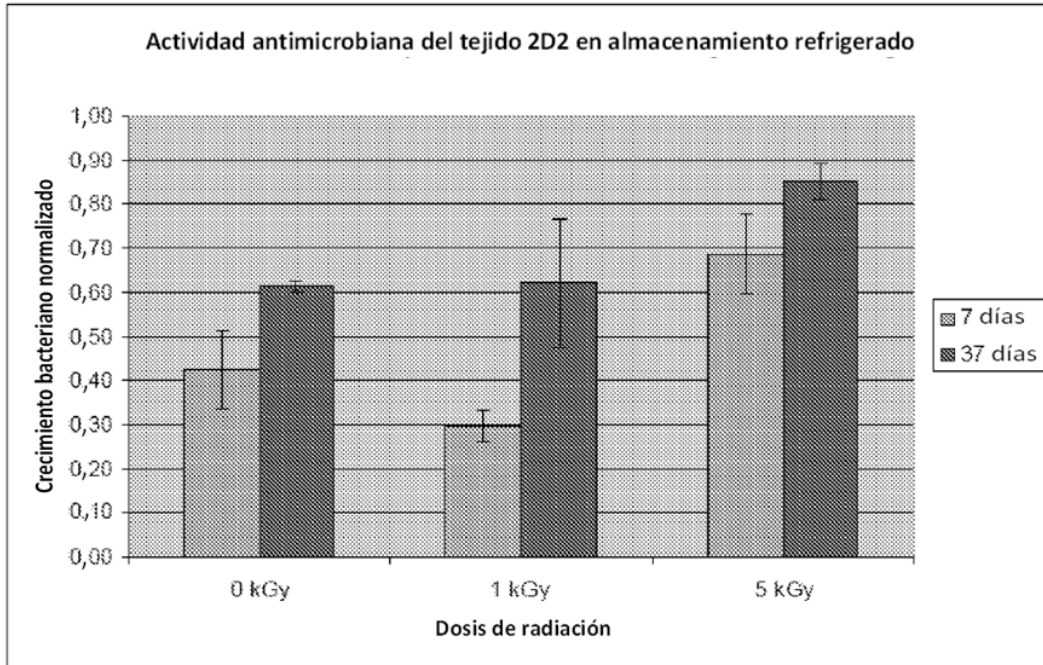


FIGURA 8

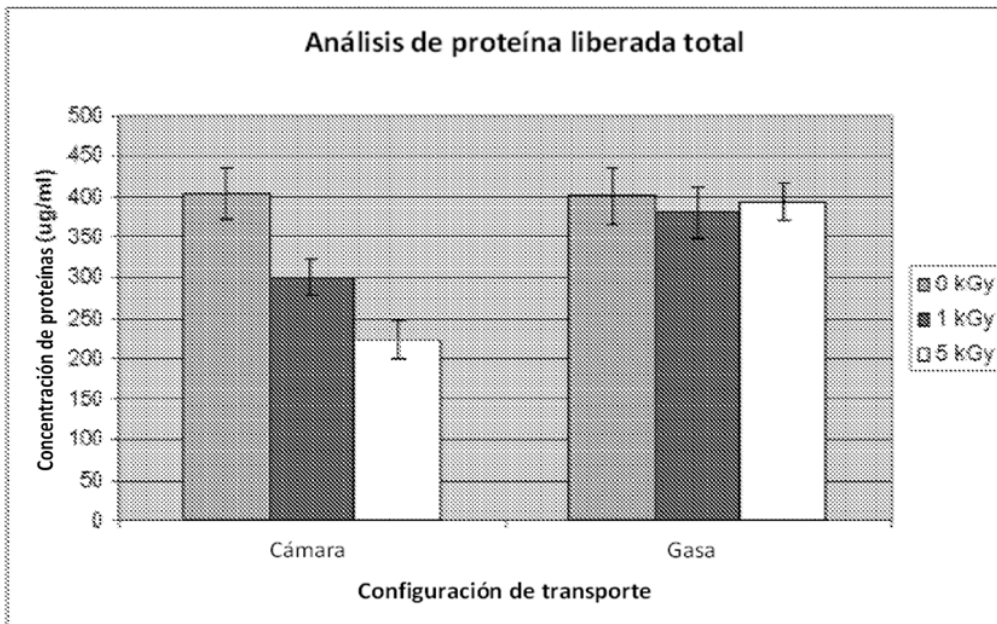


FIGURA 9

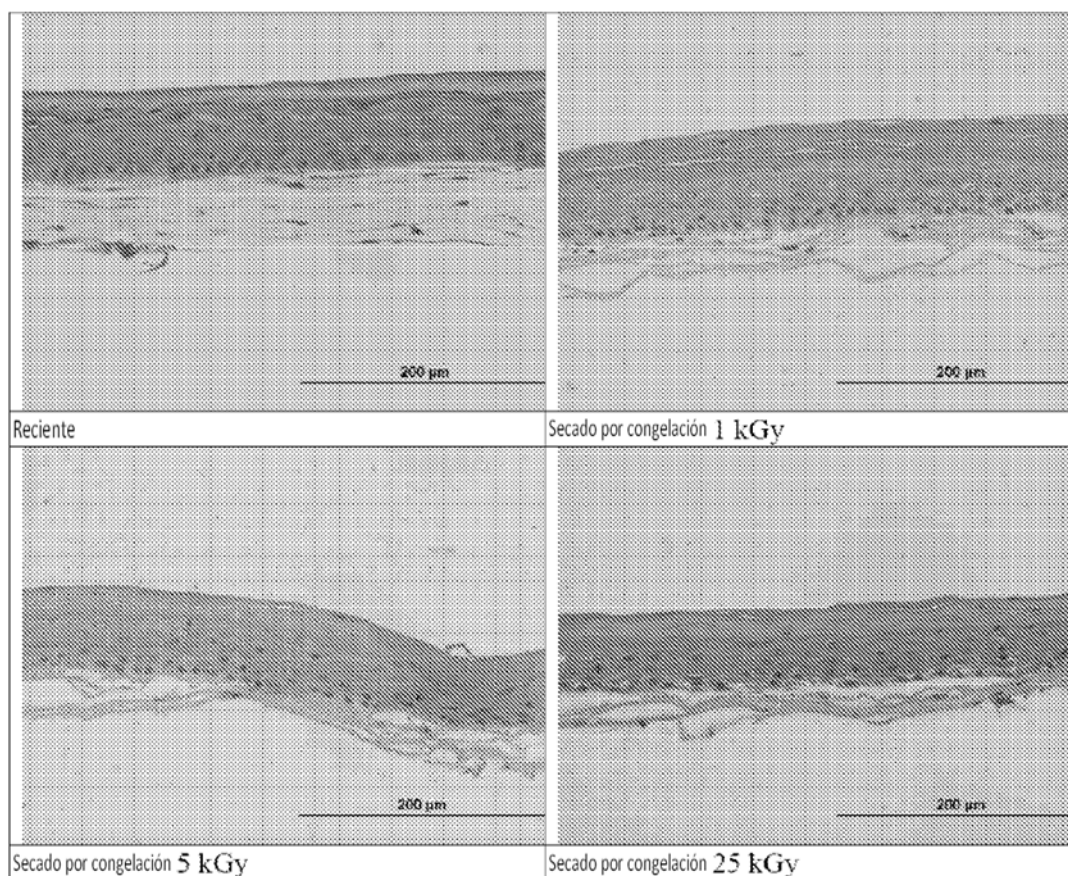


FIGURA 10

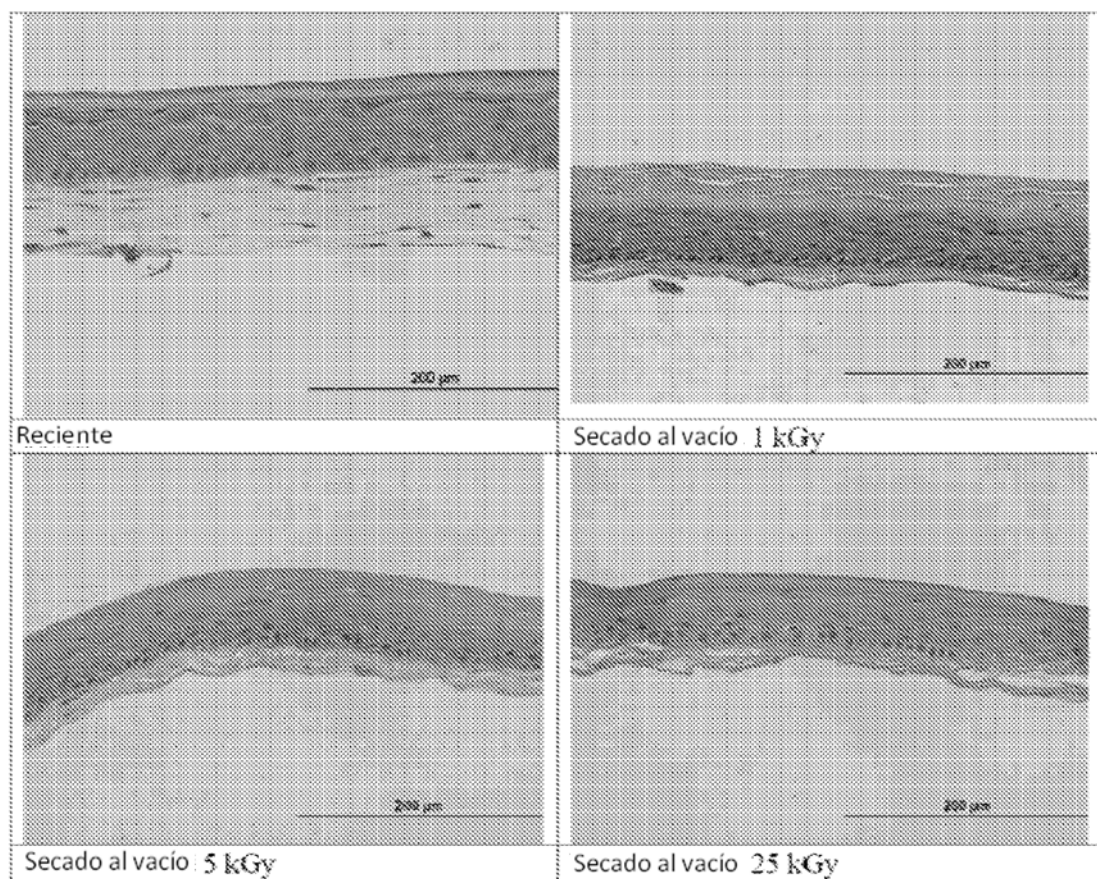


FIGURA 11

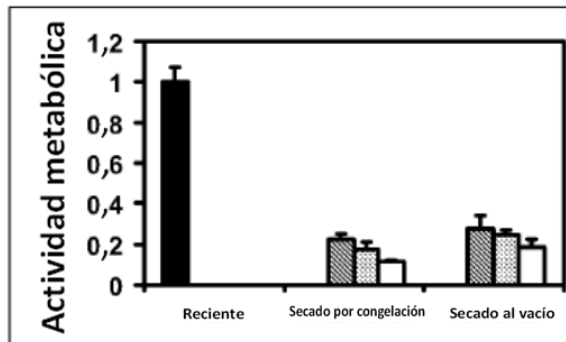


FIGURA 12

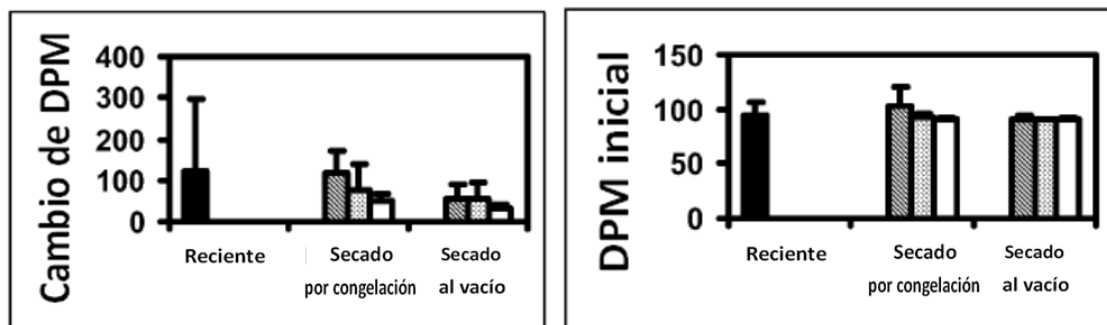


FIGURA 13

