

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 893 844**

(51) Int. Cl.:

A61F 2/10 (2006.01)

A61F 2/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 18197432 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.07.2021 EP 3470018**

(54) Título: **Criopreservación de sustitutos de piel humana viables**

(30) Prioridad:

13.03.2013 US 201361779661 P

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

10.02.2022

(73) Titular/es:

**STRATATECH CORPORATION (100.0%)
Suite 169, 505 South Rosa Road
Madison, WI 53719-1262, US**

(72) Inventor/es:

**ALLEN-HOFFMANN, B. LYNN;
PIRNSTILL, JOHN C.;
GRATZ, KENNETH R. y
COMER, ALLEN R.**

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 893 844 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

Criopreservación de sustitutos de piel humana viables

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a sistemas y procedimientos para la criopreservación de sustitutos de piel humana viables.

Antecedentes

El campo creciente de la ingeniería de tejidos (IT) está preparada para realizar enormes progresos en el tratamiento de enfermedad y disfunción de órganos en la próxima década. En 2001, hubo 23 terapéuticos a base de células que se aprobaron para el mercado en los Estados Unidos (EE.UU.) y Europa, de los cuales nueve eran sustitutos de piel o injertos y había 100 productos más en desarrollo. (De Bree, Genomics-based Drug Data Report and Regenerative Therapy (1) 2:77-96 (2001)). Una década después, los tejidos creados por ingeniería han aparecido como un sector de la industria diferenciado dentro de la industria del cuidado de heridas y representan una de las plataformas a base de células más prometedores en la medicina regenerativa. El mercado global del cuidado de heridas se estimó que era de 16,8 billones de dólares americanos en 2012 y ha estado creciendo a una tasa de aproximadamente el 6 % anualmente (Kalorama Information, abril 2012). El grueso de este mercado está comprendido de sectores tradicionales que son maduros y altamente competitivos e incluyen productos que se dirigen al cuidado de heridas básico y avanzado, cierre de heridas y antiinfecciosos. Esto ha llevado a los competidores a centrar cada vez más su atención en el desarrollo de productos altamente diferenciados en el sector del cuidado de heridas cada vez más activo e innovador, un sector que representa aproximadamente el 15 % del mercado total. Mientras que aún predomina las ventas de la terapia de heridas de presión negativa, en el 2010 las ventas de tejidos por ingeniería y otros productos dentro del mercado de la biología de los EE.UU. creció a 448 millones de dólares americanos y está proyectado aumentar a 1.058 millones de dólares americanos en 2015, una tasa de crecimiento anual compuesto del 18,8 % (análisis del mercado BioMedGPS-SmarTRAK, 2012).

Aunque existe una multitud de aplicaciones revolucionares y económicamente importantes de tejidos y órganos de ingeniería en el ámbito de la salud humana, el potencial económico completo de la industria está lejos de haberse conseguido. Actualmente, únicamente dos empresas de ingeniería de tejidos en el mundo han sido capaces de comercializar productos de sustitutos de piel a base de células centrados en la cuida de heridas cutáneas y conseguir unas ventas anuales que sobrepasa los 100 millones de dólares americanos.

Un impedimento principal en cuanto a la aceptación de tejidos de ingeniería por los profesionales médicos, proveedores sanitarios e intermediarios es la falta de medios para preservar y almacenar de forma eficaz y efectiva tejidos de ingeniería. La naturaleza de las células vivas y productos tisulares hace complicado el desarrollo de un almacenamiento a largo plazo. Los tejidos de ingeniería actuales deben almacenar y enviarse a menudo bajo condiciones cuidadosamente controladas para mantener la viabilidad y funcionar. Normalmente, los productos de tejidos de ingeniería llevan de semanas a meses en producirse, pero deben de usarse a las horas o días tras su fabricación. Como resultado, las empresas de IT deben hacer funcionar continuamente sus instalaciones de producción a una capacidad completa y absorber los costes de productos sin vender que deben desecharse. Esas pérdidas de inventario, además de los ya costosos procedimientos de fabricación, han forzado los precios a unos niveles inviables. Como ejemplo específico, APLIGRAF requiere aproximadamente cuatro semanas para ser fabricado, es útil durante únicamente 15 días y debe mantenerse entre 20 y 23 °C hasta que se use. Como otro ejemplo, EPICEL se transporta por un enfermero desde la instalación de producción de Genzyme Biosurgery en Cambridge, MA hasta el punto de uso en una incubadora portátil y se usa inmediatamente tras su llegada. Tales restricciones representan inconvenientes significantes para desarrollar productos convenientes y económicos.

Se ha explorado la criopreservación como solución al problema de almacenamiento, pero se sabe que induce daño tisular mediante la formación de hielo, daño por frío y desequilibrio osmótico. Además de APLIGRAF, el otro único equivalente de piel viva aprobado, ORCEL, se ha evaluado como producto congelado, pero tenía el inconveniente de que debía mantenerse a temperaturas por debajo de -100 °C antes de su uso. Esto requiere condiciones de suministro y almacenamiento de producto especializadas, incluido el uso de bienes peligrosos durante su transporte, así como el uso de nitrógeno líquido para su almacenamiento, lo que resulta costoso, peligroso y no disponible fácilmente en clínicas rurales y hospitales de campo.

En consecuencia, lo que se necesita en la técnica son procedimientos mejorados de criopreservación de tejidos y células de ingeniería viables para su almacenamiento en condiciones que están disponibles habitualmente en el punto de uso.

Los procedimientos de criopreservación de un equivalente de piel viva compuesto que comprende una capa epidérmica de células de queratinocitos cultivadas, una capa de colágeno de alta pureza, no porosa, y una capa dérmica de células de fibroblastos cultivados en una esponja de colágeno porosa y reticulada se conocen a partir del documento WO 02/058588 A2. El documento WO 02/058588 A2 no desvela equivalentes de piel cultivados organotípicamente que comprendan epitelios escamosos estratificados sobre una capa dérmica que comprenda fibroblastos, como requiere la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. El documento

WO 2005/012492 A2 desvela un procedimiento para proporcionar un equivalente de piel que expresa un polipéptido antimicrobiano exógeno, en el que tal polipéptido antimicrobiano es beta-defensina 1, 2 o 3 humana o la catelicidina humana. Sin embargo, el documento WO 2005/012492 A2 no desvela un procedimiento de criopreservación de los equivalentes de piel tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Un procedimiento de criopreservación de un equivalente de piel cultivado organotípicamente para mantener el tejido viable se desvela en el documento WO 96/24018 A1, que se ha calificado como el estado de la técnica más cercano en el procedimiento de examen europeo. La invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, difiere del procedimiento del documento WO 96/24018 A1 en que el procedimiento conocido implica un procedimiento de equilibrado seguido de etapas de congelación controlada con inicio externo de la cristalización del hielo extracelular y almacenamiento del equivalente de piel con exceso de medio en condiciones de fase de vapor de nitrógeno líquido. Otra diferencia radica en el hecho de que el equivalente de piel empleado en la reivindicación 1 del conjunto de reivindicaciones adjunto se ha diseñado por ingeniería para expresar y proporcionar polipéptidos antimicrobianos exógenos o factores proangiogénicos. Dichas diferencias proporcionan un procedimiento simplificado de criopreservación de un equivalente de piel cultivado organotípicamente que se ha diseñado por ingeniería para expresar y proporcionar polipéptidos antimicrobianos exógenos o factores proangiogénicos y se ha descubierto que es inventivo respecto a dicho técnica anterior de los documentos WO 96/24018 A1, WO 02/058588 A2 y 2005/012492 A2.

Sumario de la invención

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Concretamente, la invención se dirige a un procedimiento de criopreservación de un equivalente de piel cultivado organotípicamente para mantener un tejido viable que comprende: a) tratar un equivalente de piel cultivado organotípicamente en una solución crioprotectora en una única etapa, en el que dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente comprende epitelio escamoso estratificado sobre una capa dérmica que comprende fibroblastos, en el que el equivalente de piel se ha diseñado por ingeniería para expresar y proporcionar polipéptidos antimicrobianos exógenos o factores proangiogénicos, y en el que dicho crioprotector se proporciona en una solución que comprende del 21 % al 70 % de la solución en volumen, preferentemente del 21 % al 45 % de la solución en volumen o del 37,5 % al 62,5 % de la solución en volumen, más preferentemente del 25 % al 40 % de la solución en volumen o del 42,5 % al 57,5 % de dicha solución en volumen, dependiendo de la temperatura, y dicho crioprotector es glicerol; b) separar el equivalente de piel cultivado organotípicamente tratado del exceso de solución crioprotectora y envasar dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente tratado en ausencia de crioprotector adicional para proporcionar un equivalente de piel envasado, en el que dicho envase preferentemente comprende adicionalmente encerrar dicho equivalente de piel criopreservado en una bolsa estéril y encerrar dicha bolsa estéril en una segunda bolsa; y c) congelar dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente envasado para proporcionar un equivalente de piel criopreservado. Adicionalmente, la invención se dirige a un equivalente de piel criopreservado envasado producido de acuerdo con dicho procedimiento para su uso en el tratamiento de un paciente, en el que antes de la aplicación a dicho paciente dicho equivalente de piel criopreservado a) se descongela y no se enjuaga; o b) se calienta, se transfiere asépticamente desde dicho envase y se pone en contacto con un medio absorbente que comprende una solución compatible tisular para permitir la retirada de dicha solución crioprotectora por difusión. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención. Las realizaciones de la descripción que no entran en el ámbito de las reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención. La presente invención se refiere en general a sistemas y procedimientos para la criopreservación de sustitutos de piel humana viables.

La presente descripción proporciona procedimientos de criopreservación de un equivalente de piel cultivado organotípicamente para mantener un tejido viable que comprende: tratar un equivalente de piel cultivado organotípicamente en una solución crioprotectora en una única etapa; envasar el equivalente de piel cultivado organotípicamente envasado para proporcionar un equivalente de piel envasado; y congelar el equivalente de piel cultivado organotípicamente envasado para proporcionar un equivalente de piel criopreservado envasado. El crioprotector puede proporcionarse en una solución que comprende aproximadamente del 20 % o el 21 % a aproximadamente el 70 % de la solución en volumen, y más preferentemente aproximadamente del 20 % o el 21 % a aproximadamente el 45 % de la solución en volumen o del 37,5 % al 62,5 % de la solución en volumen, o lo más preferentemente de aproximadamente el 25 % al 40 % de la solución en volumen o del 42,5 % al 57,5 % de la solución en volumen, según la temperatura. El tratamiento con crioprotector puede llevarse a cabo desde aproximadamente 2 °C a 8 °C, mientras que, en otros ejemplos, la etapa de tratamiento se lleva a cabo a temperatura ambiente, por ejemplo, desde aproximadamente 15 °C a aproximadamente 30 °C. El crioprotector es glicerol. La congelación puede comprender adicionalmente congelar el equivalente de piel cultivado organotípicamente en ausencia de exceso sustancial de crioprotector. La congelación puede comprender adicionalmente congelar a aproximadamente -80 °C. La congelación puede comprender adicionalmente la exposición directa a temperaturas que varían desde aproximadamente -50 ° a -100 °C. El envasado puede comprender adicionalmente encerrar el equivalente de piel criopreservado en una bolsa estéril y encerrar la bolsa estéril en una segunda bolsa. Los equivalentes de piel cultivados organotípicamente pueden comprender células NIKS. Las células NIKS pueden comprender una secuencia de ácidos nucleicos exógena que codifica un polipéptido exógeno. El equivalente de piel puede retener la viabilidad después de su descongelación. El equivalente de piel puede tener una A₅₅₀ de al menos el 50 % de un equivalente de piel de referencia tal como se determina por un ensayo de MTT.

Los procedimientos pueden comprender adicionalmente descongelar dicho equivalente de piel criopreservado y aplicar

- dicho equivalente de piel descongelado a un paciente que lo necesita, en el que dicho equivalente de piel descongelado no se enjuaga después de dicha aplicación a dicho paciente. La presente descripción proporciona procedimiento de descongelación de un equivalente de piel criopreservado antes de su aplicación a un sujeto, que comprende: calentar el equivalente de piel criopreservado; y poner en contacto el equivalente de piel criopreservado con un mediador de difusión que comprende una solución compatible tisular para permitir la retiración de la solución crioprotectora por difusión. El calentamiento puede comprender la exposición a temperatura ambiente en el sitio de uso. El mediador de difusión se puede seleccionar del grupo que consiste en un medio absorbente, una membrana y una bolsa de diálisis. El medio absorbente se puede seleccionar del grupo que consiste en almohadillas Telfa, almohadillas de espuma, almohadillas de gasa y almohadillas celulósicas que contiene el medio compatible tisular. La solución compatible tisular puede ser una solución tamponada.
- La presente descripción proporciona procedimientos de tratamiento de un sujeto que comprende proporcionar un equivalente de piel criopreservado envasado producido tal como se ha descrito anteriormente; trasferir asepticamente el equivalente de piel criopreservado desde el envase; calentar el equivalente de piel criopreservado; poner en contacto el equivalente de piel criopreservado con un medio absorbente que comprende una solución compatible tisular para permitir la retiración de la solución crioprotectora por difusión; y aplicar el equivalente de piel criopreservado al sujeto.
- La presente descripción proporciona un equivalente de piel criopreservado equilibrado con un crioprotector, estando el equivalente de piel sustancialmente libre de exceso de crioprotector sobre la superficie exterior del equivalente de piel. La presente descripción proporciona un sistema que comprende el siguiente equivalente de piel dispuesto sobre un medio absorbente.
- La presente descripción proporciona procedimientos que comprenden proporcionar el equivalente de piel criopreservado envasado tal como se ha descrito anteriormente; y aplicar el equivalente de piel a una herida en condiciones tales que el equivalente de piel entra en contacto con la herida.
- La presente invención proporciona un kit que comprende un sustituto de piel criopreservado, un medio absorbente y una solución compatible tisular. El sustituto de piel criopreservado puede envasarse en un envoltorio sellable. El sustituto de piel criopreservado puede proporcionar en un vaso de cultivo envasado en la bolsa.
- La presente descripción proporciona un procedimiento que comprende: proporcionar una placa de cultivo que comprende un sustrato de cultivo celular móvil entre posiciones superiores e inferiores definidas en la placa de cultivo, formar un equivalente de piel sobre el sustrato de cultivo celular, en el que el sustrato de cultivo celular se encuentra en la posición superior, descender el sustrato de cultivo celular a la posición inferior para un procesamiento adicional. El procesamiento adicional puede comprender tratar el equivalente de piel con una solución crioprotectora. El procesamiento adicional puede comprender congelar el equivalente de piel en la placa de cultivo.
- La presente descripción proporciona un procedimiento de producción de un equivalente de piel criopreservado que comprende: proporcionar una placa de cultivo que comprende un inserto móvil entre posiciones superiores e inferiores definidas en la placa de cultivo, teniendo el inserto una superficie plana de fondo formada a partir de una membrana porosa, formar un equivalente dérmico que comprende células de fibroblastos sobre la membrana porosa en el inserto, en el que el inserto se coloca en la posición superior de la placa de cultivo, cultivar las células de fibroblastos para formar un equivalente dérmico, aplicar células de queratinocito al equivalente dérmico, cultivar los queratinocitos en un medio de cultivo en condiciones de modo que los queratinocitos forman un equivalente de piel que comprende epitelio estratificado, retirar el medio de cultivo, descender el inserto a la posición inferior, tratar el equivalente de piel con una solución crioprotectora y congelar el equivalente de piel en la placa de cultivo.
- La presente divulgación se refiere a procedimiento de tratamiento de un paciente que lo necesita con un equivalente de piel criopreservado fabricado mediante los siguientes procedimientos que comprenden congelar dicho equivalente de piel criopreservado y aplicar dicho equivalente de piel descongelado a dicho paciente que lo necesita, en el que dicho equivalente de piel descongelado no se enjuaga después de dicha aplicación a dicho paciente. Por razones de claridad, este aspecto de la presente divulgación no es parte de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de figuras

- La FIG. 1 es un gráfico de prueba de viabilidad de tejidos descongelados usando el ensayo de MTT. Los tejidos se criopreservaron usando un congelador de tasa controlada (CRF) o mediante congelación pasiva en un congelador ultrafrio (establecido a -80 °C) y almacenados durante hasta 3 meses, a continuación, se descongelaron y analizaron a la 1 hora y a 1 día. Se midió la viabilidad mediante análisis de MTT de tres perforaciones de 0,5 cm² a partir de cada tejido de 44 cm² en cada punto de tiempo (mediana de +/- 1 desv. est.).
- La FIG. 2 es un perfil de temperatura de un congelado de tejido pasivo simulado. Las sondas de temperatura se fijaron en la parte inferior de tres placas de 100 mm x 20 mm con un inserto de Transwell sobre la parte superior.
- La tapa se colocó sobre la placa y a continuación se envasaron dentro de un bolsillo interior de Whirl-pak y un bolsillo exterior de Mylar y se colocó en un congelador ultrafrio establecido a -80 °C. Los tejidos envasados se colocaron en una rejilla metálica en una posición de la parte inferior, media y superior.
- La FIG. 3 es un gráfico de prueba de viabilidad de tejidos descongelados usando el ensayo de MTT. Los tejidos se

criopreservaron usando un CRF y a continuación se almacenaron en congelador ultrafríos establecidos a -80 °C o -50 °C durante de 1 a 6 meses, a continuación, se descongelaron y analizaron a la 1 hora y a 1 día. Se midió la viabilidad mediante análisis de MTT de tres perforaciones de 0,5 cm² a partir de cada tejido de 44 cm² en cada punto de tiempo (mediana de +/- 1 desv. est.).

5 La FIG. 4 es un gráfico de prueba de viabilidad de tejidos descongelados usando el ensayo de MTT. Los tejidos de dos lotes independientes se criopreservaron y a continuación se almacenaron en un congelador ultrafrío establecido a -80 °C durante más de 1 mes. Se colocaron dos tejidos de cada lote en un recipiente de hielo seco durante 48 horas, con dos tejidos de control de cada lote permaneciendo en el congelador ultrafrío. Al final de la exposición al hielo seco, todos los tejidos se descongelaron y analizaron a los 15 minutos y a 1 día. Se midió la viabilidad mediante análisis de MTT de cuatro perforaciones de 0,5 cm² a partir de cada tejido de 44 cm² en cada punto de tiempo (mediana de +/- 1 desv. est.).

10 La FIG. 5 es un gráfico de prueba de viabilidad de tejidos descongelados usando el ensayo de MTT. Todos los tejidos se criopreservaron usando un CRF seguido por una reducción de temperatura progresiva (temperatura ambiente a 2-8 °C a -20 °C) durante la cual los tejidos se expusieron a una serie gradual de concentraciones de 15 glicerol empapados en almohadillas de celulosa estéril. Todos los tejidos se expusieron inicialmente a un 16,3 % de glicerol a temperatura ambiente. A continuación, todos los tejidos se cambiaron a 2-8 °C, con dos tejidos transferidos a un 32,5 % de glicerol. Por último, todos los tejidos se cambiaron a -20 °C, con un tejido transferido a un 65 % de glicerol. Los tejidos se almacenaron en fase de vapor LN₂ durante 6 días. Se midió la viabilidad mediante análisis de MTT de tres perforaciones de 0,5 cm² a partir de cada tejido de 44 cm² a la 1 hora y al 1 día después de la descongelación (mediana de +/- 1 desv. est.).

20 La FIG. 6 es un gráfico de prueba de viabilidad de tejidos descongelados usando el ensayo de MTT. Los tejidos se criopreservaron en un 65 % de glicerol mediante congelación pasiva en un congelador ultrafrío establecido a -80 °C y a continuación se almacenaron a -80 °C durante hasta 6 semanas. Los tejidos se descongelaron y se colocaron en una cámara de contención, que consistía en dos almohadillas de filtro de celulosa sobre un levantador de acero inoxidable, que contenía 100 ml de la solución especificada y se mantuvo durante 1 hora a la temperatura especificada. Los tejidos se analizaron después de 1 hora y 1 día. Se midió la viabilidad mediante análisis de MTT de tres perforaciones de 0,5 cm² a partir de cada tejido de 44 cm² en cada punto de tiempo (mediana de +/- 1 desv. est.).

25 La FIG. 7 es un gráfico de prueba de viabilidad de tejidos descongelados usando el ensayo de MTT. Los tejidos se criopreservaron en un 65 % de glicerol y, a continuación, se almacenaron en una fase de vapor LN₂ durante 2 semanas. Un tejido se descongeló directamente en una cámara de crecimiento sin una almohadilla de celulosa, mientras que el otro se colocó en una cámara de contención, que consistía en 2 almohadillas de filtro de celulosa sobre un levantador de acero inoxidable, que contenía 100 ml del medio de crecimiento. Los tejidos descongelados se mantuvieron durante 1 hora a 37 °C. Los tejidos se analizaron después de 1 hora y 1 día. Se midió la viabilidad mediante análisis de MTT de tres perforaciones de 0,5 cm² a partir de cada tejido de 44 cm² en cada punto de tiempo (mediana de +/- 1 desv. est.).

30 La FIG. 8 es un gráfico de prueba de viabilidad de tejidos descongelados usando el ensayo de MTT. Los tejidos de un lote se criopreservaron y a continuación se almacenaron en un congelador ultrafrío establecido a -80 °C durante 1 semana. Los tejidos se descongelaron durante 10 minutos, se colocaron en cámaras de contención que contenían o bien almohadillas Telfa o almohadillas Whatman empapadas con 40 ml de una solución nutritiva tamponada calentada o a bien 37 °C o a temperatura ambiente (n=2 tejidos por condición de descongelación). Los tejidos se cultivaron en las cámaras de contención durante 15-20 minutos y, a continuación, se recultivaron en una cámara de cultivo durante 1 día. Los tejidos se analizaron 1 día después de la descongelación. Se midió la viabilidad mediante análisis de MTT de cuatro perforaciones de 0,5 cm² a partir de cada tejido de 44 cm² (mediana de +/- 1 desv. est.). La especificación de la viabilidad se indica mediante la línea discontinua roja.

35 La FIG. 9 es un gráfico de prueba de viabilidad de tejidos descongelados usando el ensayo de MTT. Se trajeron tejidos de tres lotes independientes con un 50 % de glicerol de 2 a 8 °C y se criopreservaron tal como se describe en el Ejemplo 2. Los tejidos criopreservados se almacenaron en un congelador ultrafrío a aproximadamente -80 °C durante hasta 12 meses. Después de 0, 2, 3, 5 y 12 meses de almacenamiento, se descongelaron dos tejidos de cada lote a temperatura ambiente y se mantuvieron sobre medio de almohadillas Telfa saturadas durante 15 minutos. A continuación, los tejidos se devolvieron al cultivo durante la noche en una placa de cultivo con un levantador de acero inoxidable elevado, que contenía 90 ml del medio de crecimiento. Se midió la viabilidad mediante análisis de MTT de cuatro perforaciones de 0,5 cm² a partir de cada tejido de 44 cm² en cada punto de tiempo (mediana de +/- 1 desv. est.).

40 La FIG. 10 es un gráfico de prueba de viabilidad de tejidos descongelados usando el ensayo de MTT. Se trajeron tejidos de un lote con la concentración de glicerol especificada (32,5 % o 50 %) en las condiciones enumeradas antes de congelar y, a continuación, se almacenaron en un congelador ultrafrío establecido a -80 °C durante 9 días. Los tejidos se descongelaron durante 10 minutos, se colocaron sobre un apilamiento de Telf empapado con 40 ml de solución nutritiva tamponada durante 15-20 minutos y, a continuación, se recultivaron en una cámara de cultivo durante 1 día. Los tejidos se analizaron 1 día después de la descongelación. Se midió la viabilidad mediante análisis de MTT de cuatro perforaciones de 0,5 cm² a partir de cada tejido de 44 cm² (mediana de +/- 1 desv. est.). La especificación de la viabilidad se indica mediante la línea discontinua roja.

Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "equivalente de piel", "equivalente de piel humana",

"sustituido de piel humana" y "cultivos organotípicos" se usan indistintamente para referirse a un cultivo derivado in vitro de queratinocitos que se ha estratificado en epitelio escamoso. Normalmente, los equivalentes de piel se producen mediante cultivo organotípico e incluyen una capa dérmica además de una capa de queratinocitos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "estéril" se refiere a un equivalente de piel que está esencial o completamente libre de contaminación microbiana o fúngica detectable.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "células NIKS" se refiere a células que tienen las características de las células depositadas como línea celular ATCC CRL-1219. NIKS hace referencia a queratinocitos inmortalizados casi diploides.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "viable" cuando se usa haciendo referencia a un equivalente de piel se refiere a la viabilidad de células en el equivalente de piel después de la criopreservación. En realizaciones preferidas, una piel "viable" tiene una A₅₅₀ de al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de un tejido no criopreservado de control tal como se ha medido mediante un ensayo de MTT o al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % del valor de lectura de un ensayo de viabilidad similar.

Descripción detallada

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Concretamente, la invención se dirige a un procedimiento de criopreservación de un equivalente de piel cultivado organotípicamente para mantener un tejido viable que comprende: a) tratar un equivalente de piel cultivado organotípicamente en una solución crioprotectora en una única etapa, en el que dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente comprende epitelio escamoso estratificado sobre una capa dérmica que comprende fibroblastos, en el que el equivalente de piel se ha diseñado por ingeniería para expresar y proporcionar polipéptidos antimicrobianos exógenos o factores proangiogénicos, y en el que dicho crioprotector se proporciona en una solución que comprende del 21 % al 70 % de la solución en volumen, preferentemente del 21 % al 45 % de la solución en volumen o del 37,5 % al 62,5 % de la solución en volumen, más preferentemente del 25 % al 40 % de la solución en volumen o del 42,5 % al 57,5 % de dicha solución en volumen, dependiendo de la temperatura, y dicho crioprotector es glicerol; b) separar el equivalente de piel cultivado organotípicamente tratado del exceso de solución crioprotectora y envasar dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente tratado en ausencia de crioprotector adicional para proporcionar un equivalente de piel envasado, en el que dicho envase preferentemente comprende adicionalmente encerrar dicho equivalente de piel criopreservado en una bolsa estéril y encerrar dicha bolsa estéril en una segunda bolsa; y c) congelar dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente envasado para proporcionar un equivalente de piel criopreservado. . Adicionalmente, la invención se dirige a un equivalente de piel criopreservado envasado producido de acuerdo con dicho procedimiento para su uso en el tratamiento de un paciente, en el que antes de la aplicación a dicho paciente dicho equivalente cutáneo criopreservado a) se descongela y no se enjuaga; o b) se calienta, se transfiere asépticamente desde dicho envase y se pone en contacto con un medio absorbente que comprende una solución compatible tisular para permitir la retiración de dicha solución crioprotectora por difusión. Las realizaciones de la descripción que no entran dentro del ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención. Las realizaciones de la descripción que no entran en el ámbito de las reivindicaciones se proporcionan solo con fines ilustrativos y no forman parte de la presente invención.

La presente invención se refiere en general a sistemas y procedimientos para la criopreservación de sustitutos de piel humana. En particular, la presente invención se refiere a procedimientos para criopreservar equivalentes de piel humana viables de modo que puedan almacenarse durante períodos prolongados en el sitio de uso, tal como un hospital, un quirófano o una unidad de quemados. Los procedimientos que se desvelan en el presente documento permiten un aumento novedoso en la eficacia del procedimiento de preservación y utilización de equivalentes de piel preservados, incluyendo equilibrado de una sola etapa en un crioprotector, el envasado del equivalente de piel en un envase estéril antes de la criopreservación y la capacidad de usar los tejidos criopreservados para la aplicación directa a un paciente (por ejemplo, en un procedimiento de injerto) sin enjuagado. Se proporcionan equivalentes de piel criopreservados listos para usar para su uso en el tratamiento de un paciente, preferentemente para su uso en procedimientos de injerto. El equivalente de piel criopreservado está diseñado para un almacenamiento a largo plazo en el sitio de uso. Los equivalentes criopreservados pueden diseñarse por ingeniería para suministrar los péptidos de defensa de hospedador humanos de amplio espectro tales como p-defensina-3 (hBD-3) o catelicidina (hCAP18/IL-37) o factores proangiogénicos, al lecho de la herida.

Anteriormente, la piel de cadáver se ha cultivado y criopreservado mediante tratamiento con del 10 % al 20 % de glicerol como criopreservativo. Véase, por ejemplo, Kagan y col., Clin Lab Med 25 (2005) 587-605. Sorprendentemente, se ha encontrado que se necesitan concentraciones de glicerol aumentadas para preservar equivalentes de piel humana.

En consecuencia, en algunos ejemplos, la presente descripción proporciona un equivalente de piel criopreservado. En algunos ejemplos, el equivalente de piel se ha diseñado por ingeniería para expresar y proporcionar polipéptidos antimicrobianos exógenos o factores proangiogénicos. No existe limitación en cuanto al uso de ningún polipéptido antimicrobiano. El polipéptido antimicrobiano puede ser p-defensina humana 1, p-defensina humana 2, p-defensina humana 3 o catelicidina (hCAP-18/IL37) o variantes. Se pueden introducir construcciones de ácidos nucleicos o

vectores para codificar el polipéptido antimicrobiano o factor proangiogénico en los queratinocitos (por ejemplo, células NIKS) y los queratinocitos transfectados se usan para realizar el equivalente de piel mediante técnicas de cultivo organotípico. Ejemplos para la producción de equivalentes de piel que expresan polipéptidos exógenos, así como polipéptidos antimicrobianos de tipo silvestre y variantes adicionales se pueden encontrar en las Patentes de Estados Unidos n.º 7.674.291; 7.807.148; 7.915.042; 7.988.959; y 8.092.531.

Los equivalentes de piel criopreservados pueden aplicarse a heridas después de descongelarse y colocarse en su sitio. Los equivalentes de piel criopreservados pueden aplicarse temporalmente a heridas. Los equivalentes de piel humana pueden retirarse y recolocarse con equivalentes de piel humana criopreservados adicionales.

A) Equivalentes de piel producidos mediante cultivo organotípico

- 10 No existe una limitación con respecto al uso de ninguna fuente particular de células que sean capaces de diferenciarse en un epitelio escamoso. De hecho, se contempla el uso de una variedad de líneas y fuentes celulares 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 y col., *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal* 36:96-103; Patentes de Estados Unidos n.º 5.968.546 y 5.693.332), 15 prepucios neonatales (Asbill y col., *Pharm. Research* 17(9): 1092-97 (2000); Meana y col., *Burns* 24:621-30 (1998); patentes de los EE.UU. n.º 4.485.096; 6.039.760; y 5.536.656), y líneas celulares de queratinocitos inmortalizados tales como las células NM1 (Baden, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23(3):205-213 (1987)), células HaCaT (Boucamp y col., *J. cell. Boil.* 106:761-771 (1988)); y células NIKS (Línea celular BC-1-Ep/SL; patente de Estados Unidos n.º 5.989.837; 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(s) proteína(s) deseada(s). Se pueden utilizar células NIKS. El descubrimiento de una nueva línea celular de queratinocitos humanos 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 este motivo, son útiles para la aplicación de estrategias de modificación genética y expresión genética genómica para proporcionar equivalentes de piel humana con propiedades mejoradas por encima de los equivalentes de piel disponibles actualmente. Las células NIKS, identificadas y caracterizadas en la universidad de Wisconsin, no son tumorigénicas, presentan un cariotipo estable y presentan 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 muestran un tiempo de vida útil extendido en el cultivo monocapa. Esto proporciona una oportunidad para manipular genéticamente las células y aislar nuevos clones de células con nuevas propiedades útiles (AllenHoffmann y col., *J. Invest. Dermatol.*, 114(3): 444-455 (2000)).
- 35 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 40 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, sobre el pasaje 16, eran evidentes queratinocitos que presentaban células de pequeño tamaño. Sobre el pasaje 17, solo estaban presentes los queratinocitos de pequeño tamaño en el cultivo y no eran evidentes queratinocitos senescentes de gran 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 la senescencia se cultivaron en serie a una densidad de 3×10^5 células por 100-mm de placa. Normalmente, los cultivos alcanzaban una densidad celular de aproximadamente 8×10^6 células a los 7 días. Esta tasa estable de crecimiento celular se mantuvo por los 45 al menos 59 pasajes, demostrando que las células habían alcanzado la inmortalidad. Los queratinocitos que emergían de la población de senescencia original se denominan 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, VHB, HCV, parvovirus B-19, HPV-16, SV40, HHV-6, HHV-7, HPV-18 y HPV-31 utilizando el análisis PCR o Southern. No se detectó ninguno de estos virus.
- 50 55 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.
- 60 60 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 ADN 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 referencia 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 tumorigenidad *in vivo*. Por este motivo, 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 tumorigenidad 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 atípicos. 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 atípicos.

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 describen en detalle en los ejemplos. En realizaciones particularmente preferentes, 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-a 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*, mediante la pérdida de adhesión de queratinocitos célula-célula y célula-sustrato. Los queratinocitos NIKS producían la misma 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. De manera específica, 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 mult capa que se forman en el cultivo sumergido y la piel humana intacta. En cambio, las técnicas de cultivo organotípico permiten el crecimiento y diferenciación en condiciones como *in vivo*. De manera específica, 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 forma, 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 aplatan y se convierten en escamosas. Eventualmente estas células pierden el núcleo y forman estructuras cornificadas, queratinizadas. Este procedimiento 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.
- 5 Para observar características más detalladas de los cultivos organotípicos de células parentales (pasaje 5) y NIKS (pasaje 38) 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 las hemidesmosomas asociados en las capas basales de queratinocitos tanto de las células parentales como en la línea celular.
- 10 Las hemidesmosomas son estructuras especializadas que aumentan la adhesión de los queratinocitos a la lámina basal y ayudan a mantener la integridad y la resistencia del tejido. La presencia de estas estructuras 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.
- 15 20 25
- B) Criopreservación**
- La presente invención proporciona equivalentes de piel viable criopreservados tal como se define en las reivindicaciones. Los equivalentes de piel criopreservados son preferentemente almacenables a aproximadamente -50 °C, -60 °C, -70 °C, -80 °C o más frío durante un período de tiempo extendido tal como superior a 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses y hasta 12 o 24 meses sin una pérdida sustancial de viabilidad.
- 30 Preferentemente, todas las etapas del procedimiento de criopreservación antes del envasado del producto se llevan a cabo asépticamente dentro de un armario de bioseguridad de Clase 100 en una sala blanca clase 10.000. El procedimiento de criopreservación puede comprender tratar un equivalente de piel cultivado organotípicamente con una solución crioprotectora. Determinados ejemplos de la presente descripción no quedan limitado al uso de ningún crioprotector en particular. El crioprotector puede ser glicerol. El crioprotector puede proporcionarse en distintas concentraciones en la solución crioprotectora. El crioprotector puede proporcionarse en una solución que comprende aproximadamente del 20 % o el 21 % a aproximadamente el 70 % de la solución en volumen, y más preferentemente aproximadamente del 20 % o el 21 % a aproximadamente el 45 % de la solución en volumen o del 37,5 % al 62,5 % de la solución en volumen, o lo más preferentemente de aproximadamente el 25 % al 40 % de la solución en volumen o del 42,5 % al 57,5 % de la solución en volumen, según la temperatura. La solución crioprotectora puede comprender preferentemente aproximadamente 32,5 % v/v o aproximadamente 50 % v/v de crioprotector (por ejemplo, glicerol). El crioprotector puede proporcionarse en un medio de solución de base. Medios de soluciones de base incluyen, pero sin limitación, DMEM, F-10 de Ham, F-12 de Ham, DMEM/F-12, Medio 199, MEM y RPMI. El medio de base puede formar el resto del volumen de solución. La solución crioprotectora puede tamponarse. Tampones adecuados incluyen, pero sin limitación, tampones de HEPES, Tris, MOPS y Trizma. Pueden incluirse agentes tamponantes en una cantidad para proporcionar un sistema tamponado en el intervalo de pH 7,0 a 7,4. La solución crioprotectora puede tamponarse con desde aproximadamente 5 mM a 15 mM de HEPES, lo más preferentemente aproximadamente 10 mM de HEPES a un pH de aproximadamente 7,0 a 7,4.
- 35 40 45
- 50 55 60
- El tratamiento con la solución crioprotectora puede realizarse en una única etapa. Por "única etapa" se refiere a que la solución crioprotectora no se intercambia durante el procedimiento de equilibrado como es común en la técnica. Por ejemplo, la etapa de tratamiento puede llevarse a cabo usando la solución crioprotectora con una concentración definida de crioprotector al contrario de un procedimiento de equilibrado paso a paso en el que varios medios cambian con concentraciones en aumento de crioprotector en cada etapa. La etapa de tratamiento puede llevarse a cabo a una temperatura reducida. La etapa de tratamiento puede llevarse a cabo desde aproximadamente 2 °C a 8 °C, mientras que, en otros ejemplos, la etapa de tratamiento puede llevarse a cabo a temperatura ambiente, por ejemplo, desde aproximadamente 15 °C a 30 °C. El equivalente de piel puede incubarse en la solución crioprotectora durante aproximadamente de 10 a 60 minutos, preferentemente de aproximadamente 20 a 30 minutos.
- El equivalente de piel puede congelarse después del tratamiento con la solución crioprotectora. El exceso de solución crioprotectora puede retirarse del equivalente de piel antes de la congelación, por ejemplo, aspirando la solución o

moviendo el equivalente de piel tratado a un vaso nuevo. En consecuencia, el equivalente de piel tratado puede congelarse mediante su exposición a temperaturas que varían desde aproximadamente -50 °C a -100 °C y lo más preferentemente a aproximadamente -80 °C. El equivalente de piel tratado puede colocarse simplemente en una bolsa u otro vaso tal como una placa de cultivo y colocarse en una unidad de congelación tal como una unidad de congelación de baja temperatura (por ejemplo, congelador de -80 °C). En cambio, resulta común en la técnica controlar la tasa de congelación o bien controlando la temperatura en la unidad de congelación o bien colocando el tejido a congelar en un recipiente que permita el control de la tasa de disminución de temperatura. El equivalente de piel tratado puede colocarse en un vaso de cultivo estéril para su congelación. La expresión "vaso de cultivo" se refiere a cualquier vaso del tipo comúnmente usado para cultivar células o tejidos e incluye placas circulares, rectangulares y cuadradas formadas a partir de cualquier material adecuado tal como cultivo de tejidos de plástico, poliestireno, polímeros, plásticos, vidrio, etc.

El equivalente de piel criopreservado puede envasarse durante un almacenamiento a largo plazo. El equivalente de piel puede colocarse en una bolsa o un vaso de cultivo tal como se ha descrito anteriormente. La bolsa o vaso de cultivo puede estar sellado, preferentemente sellado al calor en una bolsa estéril (por ejemplo, una bolsa de plástico o polímero) para proporcionar un envasado primario. El envasado primario se sella a continuación en una bolsa secundaria, por ejemplo, un plástico secundario, hoja o bolsa de Mylar. Los tejidos criopreservados de la presente descripción pueden almacenarse preferentemente a baja temperatura, desde aproximadamente -50° C a aproximadamente -100 °C, preferentemente aproximadamente -80 °C. Los equivalentes de piel pueden almacenarse preferentemente desde aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses y hasta 12 o 24 meses sin una pérdida sustancial de viabilidad.

La presente descripción proporciona un procedimiento de descongelación de un equivalente de piel criopreservado antes de su aplicación a un sujeto, que comprende calentar dicho equivalente de piel criopreservado y poner en contacto dicho equivalente de piel criopreservado con un medio absorbente que comprende una solución compatible tisular para permitir la retiración de dicha solución crioprotectora por difusión. El equivalente de piel criopreservado en una bolsa o vaso de cultivo adecuado puede colocarse simplemente en un banco o una encimera y dejarlo descongelar. La descongelación bajo condiciones controladas como es común en la técnica no es necesaria. El equivalente de piel criopreservado puede colocarse sobre un medio absorbente para retirar solución crioprotectora descongeladas a partir del equivalente de piel. No existe limitación en cuanto al uso de un medio absorbente particular. Medios absorbentes adecuados incluyen, pero sin limitación, almohadillas Telfa, almohadillas celulósicas (por ejemplo, almohadillas de filtro Whatman 1003-090 y almohadillas de filtro de Pall 70010), almohadillas de gasa y almohadillas de espuma (por ejemplo, almohadillas de espuma hidrófilas de Covidien 55544). El medio absorbente puede ser una almohadilla Telfa. El medio absorbente puede comprender una solución compatible tisular. La solución compatible tisular puede ser una solución tamponada. Soluciones compatibles tisulares adecuadas incluyen, pero sin limitación, DMEM, F-10 de Ham, F-12 de Ham, DMEM/F-12, Medio 199, MEM y RPMI. Tampones adecuados incluyen, pero sin limitación, tampones de HEPES, Tris, MOPS y Trizma. Pueden incluirse agentes tamponantes en una cantidad para proporcionar un sistema tamponado en el intervalo de pH 7,0 a 7,4.

La presente invención proporciona kits que comprenden un sustituto de piel criopreservado, preferentemente proporcionado en un envase tal como se ha descrito anteriormente. Los kits pueden comprender adicionalmente un medio absorbente y una solución compatible tisular.

La presente descripción proporciona un procedimiento para la formación de un equivalente de piel cultivado organotípicamente y la congelación del equivalente de piel en el mismo vaso de cultivo. El vaso de cultivo puede comprender un inserto móvil entre posiciones superiores e inferiores definidas en la placa de cultivo. El inserto preferentemente comprende una superficie de parte inferior que es una membrana porosa. En uso, el vaso se carga con el medio de cultivo adecuado y se forma un equivalente dérmico sobre la membrana porosa. El equivalente dérmico se siembra, a continuación, con los queratinocitos (por ejemplo, células NIKS) en presencia del medio de cultivo adecuado. En el momento adecuado, se crea una interfaz de aire disminuyendo el nivel del medio de cultivo en el vaso y se continúa el cultivo hasta que se forma el equivalente de piel estratificado. El medio de cultivo se retira, a continuación, del vaso y el inserto de desciende a la posición inferior. La solución crioprotectora se añade para su tratamiento y a continuación se retira, y el vaso, a continuación, se transfiere a la unidad de congelación.

50 C) Usos terapéuticos

Se contempla que los equivalentes de piel criopreservados de la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones se pueden utilizar terapéuticamente. El sustituto de piel criopreservado puede usarse 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 y col., A. J. Surg. 170(1):75-83 (1995) y Patentes de los EE.

55 UU. N.º 5.693.332; 5.658.331; y 6.039.760. Los equivalentes de piel pueden usarse junto con sustitutos dérmicos tales como DERMAGRAFT o INTEGRA. En consecuencia, la presente descripción proporciona procedimientos para el cierre de heridas, incluidas úlceras o heridas causadas por quemaduras, que comprende proporcionar un equivalente de piel y un paciente que padece una herida y tratar el paciente con el equivalente de piel en condiciones de modo que la herida se cierre.

60 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 tales 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 5 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 criopreservados. Los equivalentes de piel se pueden aplicar por vía tópica en las heridas. Los equivalentes de piel 10 criopreservados que pueden usarse para su aplicación a heridas de espesor parcial. Los equivalentes de piel criopreservados pueden usarse para tratar el espesor completo de las heridas. Los equivalentes de piel criopreservados puede usarse para tratar numerosos tipos de heridas internas, que incluyen, pero sin limitarse a, heridas internas de las membranas mucosas que recubren el tracto gastrointestinal, colitis ulcerativa e inflamación de 15 membranas mucosas que puede estar producida por las terapias contra el cáncer. Los equivalentes de piel que expresan péptidos para la defensa del huésped o factores proangiogénicos pueden usarse como vendaje de heridas temporal o permanente.

Las células se pueden crear por ingeniería para proporcionar agentes terapéuticos adicionales a un sujeto. No existe limitación en cuanto al suministro de ningún agente terapéutico. De hecho, se contempla que se pueda suministrar una variedad de agentes terapéuticos al sujeto, que incluyen, pero sin limitarse a, enzimas, péptidos, hormonas peptídicas, otras proteínas, ARN ribosómico, ribozimas, ARN pequeño de interferencia (ARNip), micro ARN (miARN), 20 y ARN antisentido. Los agentes pueden ser péptidos de defensa al huésped tales como beta-defensinas humanas 1, 2, o 3 o catelicidina u otras proteínas tales como VEGF y HIF-1a, véase, por ejemplo, patentes de los EE.UU. n.º 7.674.291; 7.807.148; 7.915.042; 7.988.959; y 8.092.531. Estos agentes terapéuticos pueden suministrarse para una variedad de fines, que incluyen, pero sin limitación, al fin de corregir defectos genéticos. El agente terapéutico se suministra con el fin de desintoxicar un paciente con un error de metabolismo congénito heredado (por ejemplo, 25 aminoacidopatiesis) en el que el equivalente de piel funciona como un tejido de tipo silvestre. Se contempla que el suministro del agente terapéutico corrija el defecto. Las células se transfecan con una construcción de ADN que codifican un agente terapéutico (por ejemplo, insulina, factor IX de coagulación, eritropoyetina, etc.) y los equivalentes de piel transfectados se administran al sujeto. El agente terapéutico se suministra entonces en la corriente sanguínea 30 del paciente u otros tejidos a partir del injerto. El ácido nucleico que codifica el agente terapéutico puede estar unido operativamente a un promotor adecuado. No existe limitación en cuanto al uso de ningún promotor particular. De hecho, se contempla el uso de una variedad de promotores, que incluyen, pero sin limitarse a, promotores inducibles, constitutivos, específicos de tejidos y específicos de queratinocitos. El ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se puede introducir directamente en los queratinocitos (es decir, por electroporación, co-precipitación en fosfato 35 cárlico, o transfección por liposomas). El ácido nucleico que codifica el agente terapéutico se puede proporcionar como un vector y el vector se introduce en los queratinocitos mediante procedimientos conocidos en la técnica. El vector puede ser un vector episómico tal como un plásmido replicante. El vector puede integrarse en el genoma de los queratinocitos. Ejemplos de vectores que se integran incluyen, pero sin limitación, vectores retrovíricos, vectores de virus adenoasociados, vectores plásmidos no replicantes y vectores de transposón.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

40 Se proporcionan los siguientes ejemplos.

En la siguiente divulgación experimental, se aplican las siguientes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar); mM (millimolar); μ M (micromolar); N (Normal); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micromoles); nmol (nanomoles); g (gramos); mg (miligramos); μ g (microgramos); ng (nanogramos); 1 o l (litros); ml o mL (mililitros); μ l o μ L (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrómetros); nm (nanómetros); °C (grados centígrados); U (unidades), mU (miliunidades); min (minutos); s (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 poliacrilamida).

Ejemplo 1 (no de acuerdo con la invención)

50 El tejido de piel de StrataGraft® es un sustituto de piel humano vivo, de espesor completo, alogénico que reproduce muchas de las propiedades estructurales y biológicas de la piel humana normal. El tejido de piel de StrataGraft® contiene tanto una capa epidérmica completamente estratificada viable, derivada de células NIKS®, que son una fuente consistente y bien caracterizada de progenitores de queratinocitos humanos libres de patógenos, así como una capa dérmica que contiene fibroblastos dérmicos humanos normales (NHDF) embebidos en una matriz rica en colágeno. El tejido de piel de StrataGraft® posee una resistencia de tracción y características de manipulación 55 excelentes que permiten entrelazarse, graparse y suturarse de forma similar a los injertos de piel humana. StrataGraft® también muestra una función barrera comparable a la de la piel humana intacta que es capaz de proporcionar moléculas bioactivas para el acondicionamiento del lecho de la herida y la regeneración tisular. Las características físicas y biológicas del tejido de piel de StrataGraft lo hacen ideal para el tratamiento de una variedad de heridas de la piel.

El procedimiento de fabricación para el tejido de piel de StrataGraft® engloba tres procedimientos de cultivo celular y tisular secuenciales. En la Etapa I del procedimiento de fabricación, los queratinocitos NIKS se expanden en cultivo celular monocapa. Simultáneamente con el cultivo de queratinocitos NIKS en la Etapa I, los NHDF se expanden en cultivo monocapa y se combinan con colágeno tipo I y medio de cultivo y se dejan gelificar para formar el equivalente dérmico (ED) celularizado. Como alternativa, los NHDF se siembran en insertos Transwell y se dejan proliferar y secretar y ensamblar moléculas de matriz extracelular en un equivalente dérmico simplificado. En la Etapa II, los queratinocitos NIKS se siembran sobre la superficie del ED y se cultivan bajo condiciones sumergidas durante dos días para promover la epitelialización completa de la superficie de ED. A continuación, el tejido se sube a la interfaz de aire-líquido en la Etapa III, donde se mantiene durante 18 días en un entorno controlado, de baja humedad para promover la maduración tisular. Los equivalentes de piel se preparan en general tal como se describe en las patentes de Estados Unidos n.º 7.674.291; 7.807.148; 7.915.042; 7.988.959; y 8.092.531.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe procedimientos de criopreservación mejorados para equivalentes de piel humana. El procedimiento de producción no cambia del procedimiento actual que se ha descrito anteriormente. Todos los tejidos en el lote de suministran con medio fresco y se incuban durante la noche antes de la criopreservación. Antes de la criopreservación, todas las muestras del medio de todos los tejidos en cada lote se someten a ensayo para su esterilidad. Los tejidos restantes en cada lote se criopreservan del siguiente modo.

Parámetro	Intervalo de operación
Formulación crioprotectora	Glicerol al 50 % (v/v) DMEM (IX) HEPES 10 mM (pH 7,0 a 7,4)
Temperatura de incubación de crioprotector precongelado	2-8 °C
Tiempo de incubación de crioprotector precongelado	20-30 minutos
Procedimiento de congelación	Transferencia directa a congelador a -80 °C
Temperatura de almacenamiento	de -70 a -90 °C
Condiciones de envío	Suministro durante la noche sobre hielo seco

Descripción de procedimiento de criopreservación

- 20 Todas las etapas del procedimiento de criopreservación antes de la etapa de envasado del producto final se llevan a cabo asepticamente dentro de un armario de bioseguridad de Clase 100 en una sala blanca clase 10.000.
- Etapa 1- Enfriar previamente 100 mm de placas de cultivo que contienen 20 ml de solución crioprotectora a 2-8 °C sobre una superficie de tratamiento fría de acero inoxidable dentro de un armario de bioseguridad. La temperatura de la superficie de tratamiento fría se mantiene a 2-8 °C durante varias horas mediante el contacto con paquetes de gel congelado sumergidos en agua.
- 25 Etapa 2- Transferir Transwells que contiene tejidos de StrataGraft® en placas individuales que contiene solución crioprotectora preelefriada. Incubar tejidos 20-30 minutos en crioprotector sobre la superficie de tratamiento fría.
- 30 Etapa 3- Transferir tejidos de StrataGraft® tratados a nuevas placas de cultivo de 100 mm estériles que contienen el marcador de producto final de modo que el tejido descansa sobre la parte inferior de la placa de cultivo y devolver los tejidos a la superficie de tratamiento fría. El exceso de crioprotector se deja drenar del equivalente de piel para proporcionar un equivalente de piel tratado que está sustancialmente libre de crioprotector en exceso sobre las superficies exteriores del equivalente de piel.
- 35 Etapa 4- Sellar al calor placas de cultivo de 100 mm en bolsas transparentes y estériles. Colocar el envase primario en la bolsa Mylar secundaria, sellar al calor y transferir los tejidos envasados al recipiente de almacenamiento frío hasta que todos los tejidos estén envasados.
- 40 Etapa 5- Retirar el recipiente de almacenamiento frío con tejidos de StrataGraft® envasados de la sala blanca y transferir los tejidos a un congelador ultrabajo (de -75 °C a -80 °C). Colocar los tejidos en una rejilla enfriada previamente en el congelador que permite el flujo de aire sin restricciones a la parte superior y parte inferior de los tejidos envasados para asegurar un enfriamiento rápido y uniforme. Dejar los tejidos tranquilos durante la noche durante el procedimiento de congelación.

Los tejidos se colocan en almacenamiento en cuarentena de a -70 a -90 °C pendientes de los resultados del ensayo de liberación de lotes. Se somete a ensayo un tejido representativo de cada lote de tejido de piel de StrataGraft® criopreservado usando un panel de Control de calidad SOP que se ha usado históricamente para el ensayo de

liberación de lotes de tejido de StrataGraft®.

StrataGraft ha establecido y calificado un panel de ensayos de liberación de lotes que se usan para caracterizar tejido de piel de StrataGraft®. Se ha usado un subconjunto de estos ensayos de liberación de lotes para controlar y evaluar el impacto que los cambios en las condiciones de almacenamiento pueden tener sobre las características biológicas

5 y estructurales del tejido de piel de StrataGraft® (por ejemplo, función barrera, viabilidad y aspecto histológico). Aunque se observan en general cambios menores transitorios en el aspecto histológico de tejido de StrataGraft® después de su criopreservación, la arquitectura histológica se normaliza después de reintroducirse en cultivo organotípico durante varios días, lo que indica que las células viables en la capa basal de StrataGraft® son capaces de proliferar y reproducir la capa epidérmica después de la criopreservación. La evaluación sistemática de concentración crioprotectora, tiempo de incubación, temperatura de incubación, velocidad de congelación y condiciones de almacenamiento ha permitido a Stratatech identificar un procedimiento de criopreservación que permite el almacenamiento a largo plazo de tejido de piel de StrataGraft® con una calidad consistente y definida y que cumple las especificaciones que definen el tejido de piel de StrataGraft®.

10 15 Se evalúan los siguientes parámetros sistemáticamente durante el desarrollo del procedimiento de criopreservación de StrataGraft.

- Composición de crioprotector
- Temperatura de incubación de crioprotector precongelado
- Tiempo de incubación de crioprotector precongelado
- Número de etapas requeridas durante la incubación de crioprotector
- 20 • Velocidad de congelación
- Envasado de producto final
- Temperatura de almacenamiento
- Condiciones de envío
- Temperatura y tiempo de descongelación
- 25 • Mediador de difusión crioprotector después de descongelación
- Solución de incubación después de descongelación
- Temperatura de incubación después de descongelación
- Tiempo de incubación después de descongelación

30 Como se ha anticipado, muchos de estos parámetros individuales interactúan para incluir en las propiedades del tejido criopreservado. Por ejemplo, no es posible optimizar la concentración de crioprotector sin también tener en cuenta el tiempo y la temperatura de incubación del crioprotector. De igual modo, la temperatura de incubación después de descongelación incluye el intervalo permisible de tiempos de incubación después de descongelación. Durante el desarrollo del procedimiento de criopreservación, se identificó un intervalo de valores aceptables para cada uno de los parámetros individuales y se usó para definir la combinación final de formulación crioprotectora, tiempo de incubación antes de la congelación, temperatura de incubación antes de la congelación, velocidad de congelación y condición de almacenamiento. Los parámetros de funcionamiento del procedimiento de criopreservación tal como se ha desarrollado para la criopreservación y almacenamiento de tejido de piel de StrataGraft® se enumeran anteriormente.

35 40 Se identificó glicerol (glicerina) como el crioprotector más deseable para el tejido de StrataGraft®. El glicerol usado en la formulación crioprotectora es sintético, material de graso USP que se somete a un ensayo adicional para endotoxinas antes de su liberación para su uso. Además del glicerol, la solución crioprotectora contiene Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y HEPES 10 mM para mantener un pH de 7,0 a 7,4 en condiciones atmosféricas ambientales. El DMEM se escogió como la base para la solución de criopreservación puesto que ya es un componente del medio de cultivo usado para preparar el tejido de piel de StrataGraft®. HEPES es un agente tamponante bien caracterizado que mantiene el pH de la solución de criopreservación fuera de un entorno de CO₂.

45 50 55 Se llevó a cabo una serie de estudio para determinar una concentración de glicerol adecuada para su uso en la solución crioprotectora. Las concentraciones de glicerol sometidas a ensayo variaban del 16,25 al 65 %. En algunos casos (que no son de acuerdo con la invención), la concentración de glicerol se aumentó gradualmente en dos o tres etapas mediante incubación en una serie de soluciones con concentración de glicerol en aumento. Los estudios iniciales para demostrar la viabilidad del tejido de StrataGraft® de criopreservación usaban un procedimiento de tres etapas en el que la concentración de glicerol aumentó secuencialmente al 16,25 %, a continuación al 32,5 % y finalmente al 65 % mediante incubación durante 15-20 minutos en cada solución de glicerol, mientras que se reducía gradualmente la temperatura en cada etapa de incubación (16,25 % de incubación de glicerol a temperatura ambiente, 32,5 % a 2-8 °C y 65 % a -20 °C). Finalmente, los tejidos se congelaron a -140 °C a -15 °C/min en un congelador de velocidad controlada. Los tejidos criopreservados se transfirieron a un congelador ultrafrio (-80 °C), donde se mantuvieron hasta que se descongelaron para su análisis. Mientras que este procedimiento de tres etapas podría usarse para preservar la viabilidad y la arquitectura histológica de los tejidos de StrataGraft® durante el almacenamiento criopreservado, la complejidad de tener múltiples etapas con distintas soluciones llevadas a cabo a distintas temperaturas introduce la ocasión de error y no es enmendable para un procedimiento para su ampliación que se requeriría para su comercialización.

60 El análisis de tejidos criopreservados con este procedimiento de tres etapas reveló que, después de descongelación

y diluir el crioprotector, los tejidos mostraron viabilidad (evaluada mediante la capacidad de células viables en el tejido en convertir MTT a su producto de formazán), arquitectura histológica y función barrera comparable con los tejidos que no se criopreservaron. Los tejidos mantuvieron altos niveles de viabilidad después de la reintroducción en cultivo organotípico durante hasta nueve días después de su descongelación, demostrando que la actividad metabólica que se detectó poco después de la descongelación no era solo actividad enzimática residual.

Durante estos estudios iniciales, se encontró que la concentración de glicerol en tejidos criopreservados podría reducirse después de descongelar también incubando los tejidos en una serie de soluciones con concentración de glicerol en aumento o colocando los tejidos en un tanque de medio con una almohadilla de filtro justo por debajo del tejido para moderar la difusión de glicerol. Según estos resultados, estudios posteriores usaban principalmente el enfoque de etapa única de incubar tejidos descongelados en medio de cultivo con una almohadilla para moderar la difusión de glicerol. Véase la Figura 7.

Después de demostrar la viabilidad de criopreservación de tejido de piel de StrataGraft® usando el procedimiento de tres etapas, usamos este procedimiento como punto de referencia frente al cual comparar las simplificaciones con respecto al procedimiento de criopreservación. Estos estudios examinaron la reducción del número de etapas requeridas para alcanzar la misma concentración de glicerol final (65 %) o evaluar las concentraciones de glicerol finales que era inferiores que las usadas en los estudios iniciales. Basándose en estos estudios, se determinó que las concentraciones de glicerol tan bajas como 32,5 % podrían usarse para mantener de forma reproducible la viabilidad y arquitectura histológica de tejido de StrataGraft® durante el almacenamiento criopreservado. En cambio, una concentración final de glicerol de 16,25 % en la solución crioprotectora no soportó el mantenimiento de la viabilidad en tejidos congelados. Véase la Figura 5. Mediante la evaluación de un intervalo de concentraciones de glicerol, se determinó que una solución crioprotectora que contenía un 50 % de glicerol soportó de forma reproducible la criopreservación de tejido de piel de StrataGraft® y proporcionó un margen de error por encima de concentraciones de glicerol algo inferiores (por ejemplo, 32,5 %) que también soportó una criopreservación eficaz.

Temperatura de incubación de crioprotector precongelado, tiempo de incubación y número de etapas de incubación

Además de la concentración de glicerol en la solución crioprotectora, otros tres factores que afectaban el tratamiento de tejido de StrataGraft® con crioprotector antes de la criopreservación son: 1) el tiempo de incubación de crioprotector precongelado, 2) la temperatura en la que los tejidos se tratan con crioprotector y 3) el número de etapas requeridas para alcanzar la concentración de glicerol final. Como se ha descrito anteriormente, estudios de viabilidad iniciales con el procedimiento de tres etapas implicó la incubación secuencial de los tejidos en soluciones con concentraciones de glicerol en aumento a temperaturas sucesivamente inferiores durante 15-20 minutos en cada etapa. Tal como se ha indicado anteriormente, es preferente un procedimiento de criopreservación más simple para evitar la complejidad de tener múltiples etapas con distintas soluciones llevadas a cabo a distintas temperaturas para reducir la oportunidad de error y facilitar la ampliación del procedimiento. Con este objetivo, se evaluó la necesidad de un aumento progresivo en la concentración de crioprotector y la reducción progresiva en la temperatura durante la fase de equilibrado de crioprotector antes de la congelación.

En una serie de estudios llevado a cabo junto con la evaluación de distintas concentraciones de crioprotector, se determinó que los tejidos de StrataGraft® tratados con soluciones de crioprotector que contenían 32,5, 50 o 65 % de glicerol en una única etapa a 2-8 °C durante tan poco tiempo como 15 minutos y siempre y cuando 60 minutos fueron todos capaces de soportar la criopreservación con una pérdida mínima de viabilidad o arquitectura epidérmica. Aunque no se observó ninguna disminución en el rendimiento del tejido con tiempos de tratamiento de crioprotector de hasta 60 minutos, se escogieron tiempos de tratamiento de glicerol relativamente cortos (de 20 a 30 minutos) para minimizar cualquier efecto adverso posible de la exposición prolongada con respecto al crioprotector antes de su congelación.

Velocidad de congelación

Como se ha descrito anteriormente, los estudios de viabilidad iniciales utilizaron un congelador de velocidad controlada para congelar tejidos a una velocidad de -15 °C/min después de su equilibrado con crioprotector. Sin embargo, el uso de un congelado con velocidad controlada impondría costes adicionales significativos y no es enmendable para la ampliación del procedimiento. Históricamente, la criopreservación de células humanas se ha conseguido a una velocidad más moderada de aproximadamente -1 °C/min sin el uso de congeladores de velocidad controlada. Este se consigue habitualmente colocando viales de células en un congelador ultrafrio en una caja o recipiente aislado diseñado para moderar la velocidad de enfriamiento a aproximadamente -1 °C/min.

Se diseñaron estudios de desarrollo de procedimiento para determinar si los tejidos de StrataGraft® podrían criopreservarse sin usar un congelador con velocidad controlada. Estos estudios demostraron que los tejidos congelados mediante transferencia directa a un congelador ultrafrio (aproximadamente -80 °C) después de su tratamiento con crioprotector tuvieron un rendimiento tan bueno como los tejidos congelados en un congelador con velocidad controlada. Véase la Figura 1.

Se llevaron a cabo estudios de control de temperatura para supervisar la temperatura de los tejidos durante el procedimiento de criopreservación. Después de su envasado en una bolsa estéril interna y una bolsa Mylar externa,

los tejidos de StrataGraft® se transfieren a la rejilla enfriada previamente dentro de un congelador ultrafrío. Cada tejido se coloca en un huevo separado en la rejilla del congelador, con un amplio espacio por encima y por debajo del tejido para permitir el flujo de aire sin restricciones durante el procedimiento de congelación. Mediante el uso de sondas de control de temperatura posicionadas dentro de placas de cultivo envasadas tal como se ha descrito anteriormente y cargadas en las rejillas del congelador en esta configuración, la temperatura disminuye rápidamente a aproximadamente -50 °C dentro de los primeros 15 minutos, después se enfria aproximadamente a -65 °C a los 30 minutos y alcanza una temperatura final de aproximadamente -80 °C después de tres horas. No existe una diferencia significativa en los perfiles de temperatura entre tejidos colocados en las posiciones de parte superior, parte del medio y parte inferior de la rejilla del congelador. Véase la Figura 2.

10 *Envase de producto final*

En estudios iniciales, los tejidos se congelaron en contacto con una capa de solución crioprotectora después de su incubación con crioprotector. Aunque los tejidos criopreservados de este modo mostraron propiedades después de la descongelación buenas, la rápida descongelación de tejidos congelados en contacto con esta capa de crioprotector requirieron la incubación durante varios minutos en un baño de agua a 35-39 °C, lo que resultaría difícil de implementar y estandarizar en un área quirúrgica. Se determinó, posteriormente, que el contacto con la solución crioprotectora no era requerido después de que los tejidos se hubieran tratado con crioprotector. Esto permitió el desarrollo de la configuración del producto final en la que los tejidos se transfieren a una placa de cultivo de 100 mm estéril vacía después de su tratamiento con crioprotector, donde se congelan en contacto con la parte inferior de la placa vacía en lugar de congelarse en contacto con una capa de solución crioprotectora.

20 Para mantener la esterilidad de los tejidos criopreservados, las placas de cultivo de 100 mm que contenían tejidos tratados con crioprotector se envasaron asépticamente y se sellaron al calor dentro de una bolsa de muestra de polietileno estéril. La bolsa interna se sella al calor dentro de una bolsa resistente a los pinchazos, de grado alimentario, de poliéster/polietileno metalizado, que protege los tejidos envasados de la luz, humedad y proporciona una barrera contra el vapor de CO₂ durante su envío sobre hielo seco. Los estudios de estabilidad y comparabilidad descritos a continuación utilizaron tejidos envasados y criopreservados en esta configuración.

Temperatura de almacenamiento

La criopreservación de equivalente de piel viables permite a los centros de quemados tener un fácil acceso a este terapéutico medicinal regenerativo a base de células para quemaduras y otras indicaciones que requieran una intervención rápida. De forma óptima, los centros de quemados principales serían capaces de mantener un inventario del producto para su uso sin la necesidad de programar un envío caso por caso. En estudios de viabilidad tempranos, los tejidos criopreservados se almacenaban a -196 °C en un congelador de nitrógeno de fase de vapor. Puesto que los centros de quemados no tienen normalmente capacidades de almacenamiento de nitrógeno líquido, se desarrollaron procedimientos de criopreservación que permitían el almacenamiento de tejido durante al menos seis meses en congeladores ultrafríos (de -60 °C a -90 °C), que ya hay disponibles en bancos de sangre y de tejidos en la mayoría de los hospitales y centros de trauma. Los resultados de estos experimentos demostraron que mientras que los tejidos almacenados a -50 °C mostraron pérdidas significativas de viabilidad durante el curso de varias semanas, los tejidos almacenados a -80 °C retenían los niveles de viabilidad comparables con los tejidos que se habían almacenado en vapor de nitrógeno. Véase la Figura 3. Estos resultados se obtuvieron con varios lotes independientes de tejido criopreservado, confirmando la reproducibilidad de este hallazgo. Tal como se describe en la sección de 40 *Estabilidad de tejidos criopreservados* a continuación, el análisis de los tejidos almacenados a -80 °C durante seis meses no reveló una pérdida significante de viabilidad ni cambios con respecto a la arquitectura epidérmica durante su almacenamiento.

Condiciones de envío

45 El tejido de piel de StrataGraft® criopreservado se enviará a sitios clínicos sobre hielo seco para su suministro a la mañana siguiente mediante correo comercial tal como FedEx o UPS. El contenedor de envío (Freezetherm FT29, Laminar Medica) es una caja de envío de hielo seco validada que soporta suficiente hielo seco para mantener los tejidos criopreservados a <-75 °C durante al menos 72 horas a temperatura ambiente de hasta 35 °C para tener en cuenta los posibles retrasos en su envío. Los datos experimentales indican que el almacenamiento de tejidos criopreservados en el contenedor de envío con hielo seco durante >48 horas no tiene ningún efecto adverso detectable en la viabilidad del tejido o arquitectura histológica. Véase la Figura 4. Después de su recepción en el sitio clínico, los tejidos de StrataGraft criopreservados se almacenarán en un congelador ultrafrío (por ejemplo, de -60 °C a -90 °C) hasta su uso.

Preparación pre-operativa de tejido criopreservado

55 Antes de su uso clínico, el tejido de StrataGraft criopreservado se descongela e incuba brevemente sobre almohadillas saturadas con medio de cultivo para retirar crioprotector residual. Debido a la geometría del tejido, la fase de descongelación es rápida. Después de que se hayan descongelado los tejidos, se transfieren asépticamente los insertos de Transwell que contienen el tejido al campo estéril y se colocan en placas estériles que contienen almohadillas absorbentes saturadas con medio de cultivo. Como se describe a continuación, el tiempo de la fase de

incubación de después de la descongelación es lo suficientemente flexible para acomodar retrasos que se podrían anticipar razonablemente durante su uso clínico.

Temperatura y tiempo de descongelación

Tal como se ha descrito en la sección de *Envasado de producto final* anterior, los tejidos se criopreservan en una placa de cultivo sin una capa de solución crioprotectora, lo que permite que los tejidos se descongelen rápidamente a temperatura ambiente simplemente colocando el envase sobre una encimera o mesa. No se requiere un control preciso sobre la temperatura y tiempo de descongelación, ya que los datos experimentales muestran que los tejidos descongelados durante tiempos variantes a temperaturas que variaban de 22 °C a 40 °C mostraban propiedades después de la descongelación similares.

10 Solución de incubación después de descongelación

Las soluciones de incubación después de descongelación tamponadas funcionan mejor que las soluciones no tamponadas. Los tejidos incubados en soluciones salinas no tamponadas simples (solución salina normal o lactato de Ringer) no sobreviven ni los tejidos incubados en soluciones a base de medio de cultivo. Son preferentes el medio de cultivo de StrataTech SM01 (serie de StrataLife) o medio DMEM/F12 comercialmente disponible con HEPES. Véase la Figura 6.

Temperatura de incubación después de descongelación

Estudios de desarrollo iniciales encontraron que el medio de cultivo tamponado era capaz de soportar la viabilidad de tejidos después de una incubación después de la descongelación tanto a 37 °C como a temperatura ambiente. Sin embargo, temperaturas de incubación después de descongelación templadas (37 °C) funcionan mejor que temp. más frías (20-25 °C) para solución de incubación sub-óptimas. Véase la Figura 6. Empezar la incubación después de la descongelación sobre una almohadilla que contiene media a 37 °C que se enfriá lentamente a temperatura ambiente durante el transcurso de 15-30 minutos también funciona bien. Una temp. superior parece ser más importante en los primeros pocos minutos después de la descongelación.

Estudios de desarrollo posteriores demostraron que soluciones de medio tamponado pre-templadas a solo temperatura ambiente fueron comparable a medio templado a 37 °C en su capacidad de soportar las propiedades de tejidos descongelados. Esto fue verdadero para tejidos mantenidos tanto sobre almohadillas Telfa como almohadillas Whatman. Véase la Figura 8

Tiempo de incubación después de descongelación

Los tejidos se pueden dejar sobre la almohadilla de medio saturado durante tiempos que varían desde 15 min a 4 h a 20-25 °C o hasta 2 h a 40 °C sin un efecto significante sobre la viabilidad de los tejidos.

ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Estabilidad de tejidos criopreservados

Aunque muchos de los estudios descritos anteriormente analizaban tejidos que habían sido almacenados en un estado congelado durante solo unos pocos días o semanas, se acepta ampliamente que la mayoría del daño a las células y tejidos criopreservados se produce durante las etapas de congelación y descongelación, con una relativa poca pérdida de viabilidad celular que tiene lugar durante el almacenamiento a largo plazo a temperaturas reducidas. Los resultados de almacenamiento a largo plazo muestran que el tejido de piel de StrataGraft® criopreservado mantiene altos niveles de viabilidad y arquitectura histológica después de al menos 12 meses de almacenamiento a temperaturas ultracongeladas. Los análisis de tejidos producidos y criopreservados que usan el procedimiento de criopreservación descrito anteriormente indican que los tejidos criopreservados con este procedimiento mantienen propiedades biológicas, estructurales y físicas clave durante su almacenamiento durante al menos 12 meses a temperaturas ultrafrías. Véase la Figura 9.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe procedimientos de criopreservación mejorados para equivalentes de piel humana utilizando una etapa de tratamiento de pre-congelación con soluciones de criopreservación que contienen glicerol al 32,5 % o 50 % a temperatura ambiente. El procedimiento de producción no cambia del procedimiento actual que se ha descrito anteriormente. Al final del procedimiento de producción, los tejidos se tratan y criopreservan del siguiente modo.

Parámetro	Intervalo de operación
Formulación crioprotectora	Glicerol al 32,5 % (v/v) DMEM (IX) HEPES 10 mM (pH 7,0 a 7,4) o Glicerol al 50 % (v/v) DMEM (IX) HEPES 10 mM (pH 7,0 a 7,4)
Temperatura de incubación de crioprotector precongelado	Temperatura ambiente
Tiempo de incubación de crioprotector precongelado	15-45 minutos
Procedimiento de congelación	Transferencia directa a congelador a -80 °C
Temperatura de almacenamiento	de -70 a -90 °C
Condiciones de envío	Suministro durante la noche sobre hielo seco

Descripción de procedimiento de criopreservación

Todas las etapas del procedimiento de criopreservación antes de la etapa de envasado del producto final se llevan a cabo asépticamente dentro de un armario de bioseguridad de Clase 100 en una sala blanca clase 10.000.

- 5 Etapa 1- Dispensar 20 ml de solución crioprotectora a 100 mm de placas de cultivo.
 Etapa 2- Transferir Transwells que contiene tejidos de StrataGraft® en placas individuales que contiene solución crioprotectora. Incubar tejidos 15-45 minutos en crioprotector.
- 10 Etapa 3- Transferir tejidos de StrataGraft® tratados a nuevas placas de cultivo de 100 mm estériles que contienen el marcador del producto final de modo que el tejido descansa sobre la parte inferior de la placa de cultivo. El exceso de crioprotector se deja drenar del equivalente de piel para proporcionar un equivalente de piel tratado que está sustancialmente libre de crioprotector en exceso sobre las superficies exteriores del equivalente de piel.
- 15 Etapa 4- Sellar al calor placas de cultivo de 100 mm en bolsas transparentes y estériles. Colocar el envase primario en la bolsa Mylar secundaria y sellar al calor.
- 20 Etapa 5- Retirar los tejidos de StrataGraft® envasados de la sala blanca y transferir los tejidos a un congelador ultrabajo (de -75 °C a -80 °C). Colocar los tejidos en una rejilla enfriada previamente en el congelador que permite el flujo de aire sin restricciones a la parte superior y parte inferior de los tejidos envasados para asegurar un enfriamiento rápido y uniforme. Dejar los tejidos tranquilos durante la noche durante el procedimiento de congelación.
- 25 Los tejidos criopreservados se descongelaron a temperatura ambiente durante 10 minutos, se transfirieron a una cámara de contención que contenía almohadillas Telfa saturadas con 40 ml de medio de cultivo tamponado con HEPES que se habían calentado a temperatura ambiente y se mantuvo a TA durante de 15 a 20 minutos. Los tejidos se transfirieron a una placa de cultivo que contenía 90 ml de medio de SM01 y se devolvieron al cultivo durante la noche. Los tejidos se analizaron para su viabilidad después del recultivo durante la noche. Los tejidos pretratados con glicerol al 32,5 % a temperatura ambiente durante de 15 a 45 minutos tenían una viabilidad después de la descongelación aceptable. Los tejidos tratados con glicerol al 50 % a temperatura ambiente durante 15 minutos también tenían una viabilidad aceptable; sin embargo, los tejidos tratados con 50 % de glicerol a temperatura ambiente durante 45 minutos tenían una viabilidad inaceptable. Véase la Figura 10.

Ejemplo 4

- 30 Los ensayos de MTT se llevan a cabo preferentemente del siguiente modo. Las muestras se extirpan del tejido de piel usando un punzón de biopsia de 8 mm. Las muestras se transfieren a 0,3 ml de medio de ensayo de MTT (1 mg/ml de reactivo de MTT en F-12 de Ham) en una placa de 24 pocillos que se ha precalentado a 37 °C / 5 % de CO₂. Las muestras se incuban durante 85-95 minutos a 37 °C / 5 % de CO₂. Las muestras se inmunoborran y transfieren a 2 ml de isopropanol. Las muestras se mezclan exhaustivamente para extraer completamente el producto de formazán morado. Se alicuotan 200 µl en triplicado de cada extracto en una placa de 96 pocillos, usando isopropanol como un blanco). La absorbancia (550 nm) se mide en un espectrofotómetro.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de criopreservación de un equivalente de piel cultivado organotípicamente para mantener un tejido viable que comprende:

- 5 a) tratar un equivalente de piel cultivado organotípicamente en una solución crioprotectora en una única etapa, en la que dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente comprende epitelio escamoso estratificado sobre una capa dérmica que comprende fibroblastos, en el que el equivalente de piel se ha diseñado por ingeniería para expresar y proporcionar polipéptidos antimicrobianos exógenos o factores proangiogénicos, y en el que dicho crioprotector se proporciona en una solución que comprende del 21 % al 70 % de la solución en volumen, preferentemente del 21 % al 45 % de la solución en volumen o del 37,5 % al 62,5 % de la solución en volumen, lo más preferentemente del 25 % al 40 % de la solución en volumen o del 42,5 % al 57,5 % de dicha solución en volumen, dependiendo de la temperatura, y dicho crioprotector es glicerol;
- 10 b) separar el equivalente de piel cultivado organotípicamente tratado del exceso de solución crioprotectora, y envasar dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente tratado en ausencia de crioprotector adicional para proporcionar un equivalente de piel envasado, en el que dicho envase preferentemente comprende adicionalmente encerrar dicho equivalente de piel criopreservado en una bolsa estéril y encerrar dicha bolsa estéril en una segunda bolsa; y
- 15 c) congelar dicho equivalente de piel cultivado organotípicamente envasado para proporcionar un equivalente de piel criopreservado.

20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento de un equivalente de piel cultivado organotípicamente en una solución crioprotectora en una única etapa es a una temperatura de 2 °C a 8 °C o de 15 °C a 30 °C.

25 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha congelación comprende adicionalmente congelar a -80 °C o exposición directa a temperaturas que varían de -50 °C a -100 °C.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho equivalente de piel retiene la viabilidad después de descongelarse, en el que dicho equivalente de piel criopreservado tiene preferentemente una A₅₅₀ de al menos el 50 % de un equivalente de piel de referencia tal como se determina por un ensayo de MTT.

5. Un procedimiento de descongelación de un equivalente de piel criopreservado producido mediante el procedimiento de la reivindicación 1 antes de la aplicación a un paciente, que comprende:

- 30 a) calentar dicho equivalente de piel criopreservado, en el que dicho calentamiento comprende preferentemente la exposición a temperatura ambiente en el sitio de uso; y
- b) poner en contacto dicho equivalente de piel criopreservado con un mediador de difusión seleccionado entre el grupo que consiste en un medio absorbente, una membrana y una bolsa de diálisis, y que comprende una solución compatible tisular, preferentemente una solución compatible tisular tamponada, para permitir la retiración de dicha solución crioprotectora mediante difusión.

35 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho mediador de difusión es un medio absorbente, en el que dicho medio absorbente se selecciona preferentemente entre el grupo que consiste en almohadillas Telfa, almohadillas de espuma, almohadillas de gasa y almohadillas celulósicas que contienen dicho medio compatible tisular.

7. Un equivalente de piel criopreservado producido mediante el procedimiento de la reivindicación 1.

40 8. Un sistema que comprende el equivalente de piel de la reivindicación 7 colocado sobre un medio absorbente.

9. Equivalente de piel criopreservado envasado de la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de heridas, en el que dicho equivalente de piel es para aplicación a una herida en condiciones de modo que dicho equivalente de piel entra en contacto con dicha herida.

45 10. Un kit que comprende un equivalente de piel criopreservado de la reivindicación 7, un medio absorbente y una solución compatible tisular.

11. El kit de la reivindicación 10, en el que dicho equivalente de piel criopreservado se envasa en un envoltorio sellable o dicho equivalente de piel criopreservado se proporciona en un vaso de cultivo envasado en una bolsa.

12. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la formación del equivalente de piel cultivado organotípicamente antes de la etapa (a) mediante:

- 50 la proporción de una placa de cultivo que comprende un sustrato de cultivo celular móvil entre posiciones superiores e inferiores definidas en dicha placa de cultivo, la formación de un equivalente de piel sobre dicho sustrato de cultivo celular, en el que dicho sustrato de cultivo celular se encuentra en dicha posición superior y, a continuación, descender dicho sustrato de cultivo celular a dicha posición inferior para llevar a cabo la etapa (a) de la reivindicación 1.

13. El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la formación del equivalente de piel cultivado organotípicamente antes de la etapa (a) mediante:
- 5 la proporción de una placa de cultivo que comprende un inserto móvil entre posiciones superiores e inferiores en dicha placa de cultivo, teniendo dicho inserto una superficie plana de fondo formada a partir de una membrana porosa,
- 10 la formación de un equivalente dérmico que comprende células de fibroblastos sobre dicha membrana porosa en dicho inserto, en el que dicho inserto se coloca en dicha posición superior en dicha placa de cultivo, el cultivo de dichas células de fibroblastos para formar un equivalente dérmico,
- 15 la aplicación de queratinocitos a dicho equivalente dérmico,
- 20 el cultivo de dichos queratinocitos en un medio de cultivo en condiciones de modo que dichos queratinocitos formen un equivalente de piel que comprende epitelio estratificado,
- la retiración de dicho medio de cultivo,
- el descenso de dicho inserto a dicha posición inferior para llevar a cabo la etapa (a) de la reivindicación 1.
14. Equivalente de piel criopreservado envasado producido de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un paciente, en el que antes de la aplicación a dicho paciente dicho equivalente de piel criopreservado
- a) se descongela y no se enjuaga; o
- b) se calienta, se transfiere asepticamente desde dicho envase y se pone en contacto con un medio absorbente que comprende una solución compatible tisular para permitir la retiración de dicha solución crioprotectora por difusión.
- 20 15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que en la etapa (a) se produce a una temperatura de 2 °C a 8 °C durante 15 minutos a 60 minutos, el equivalente de piel se incuba en la solución crioprotectora durante 10 a 60 minutos, preferentemente de 20 a 30 minutos.

Figura 1

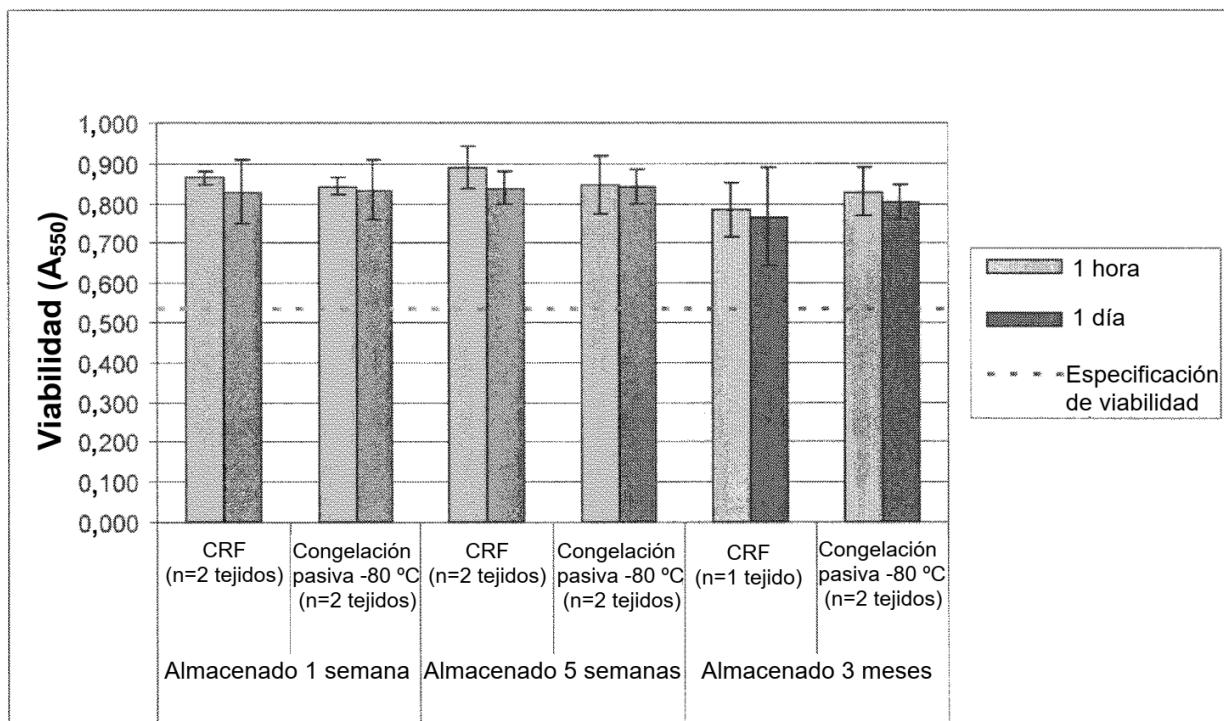


Figura 2

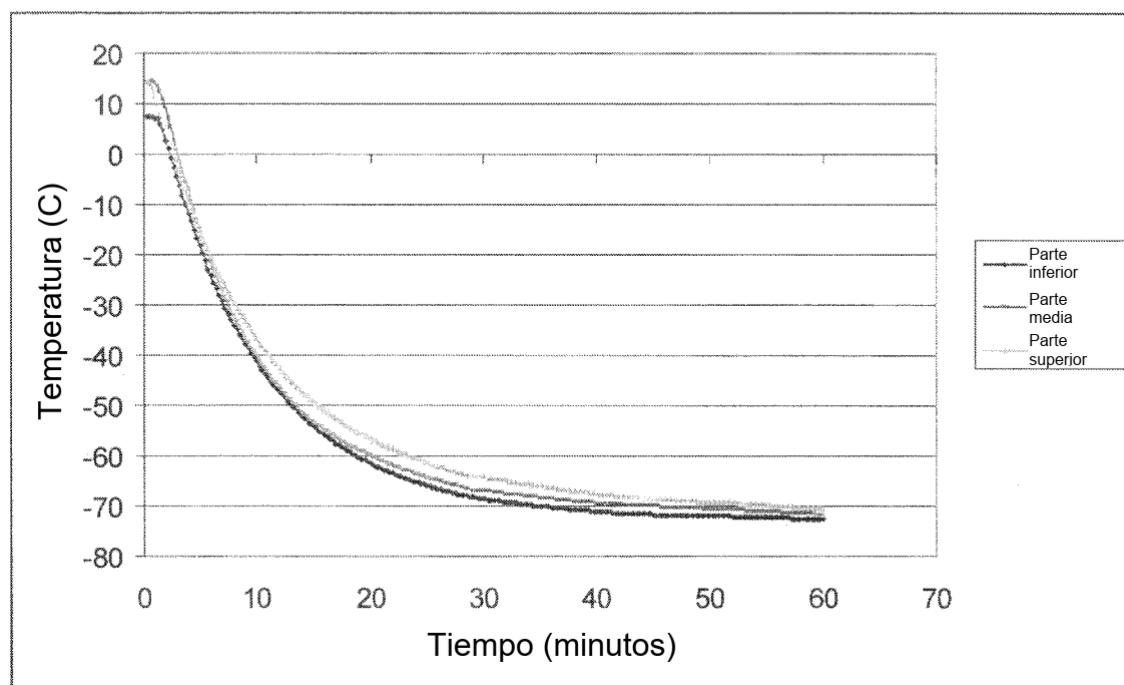


Figura 3

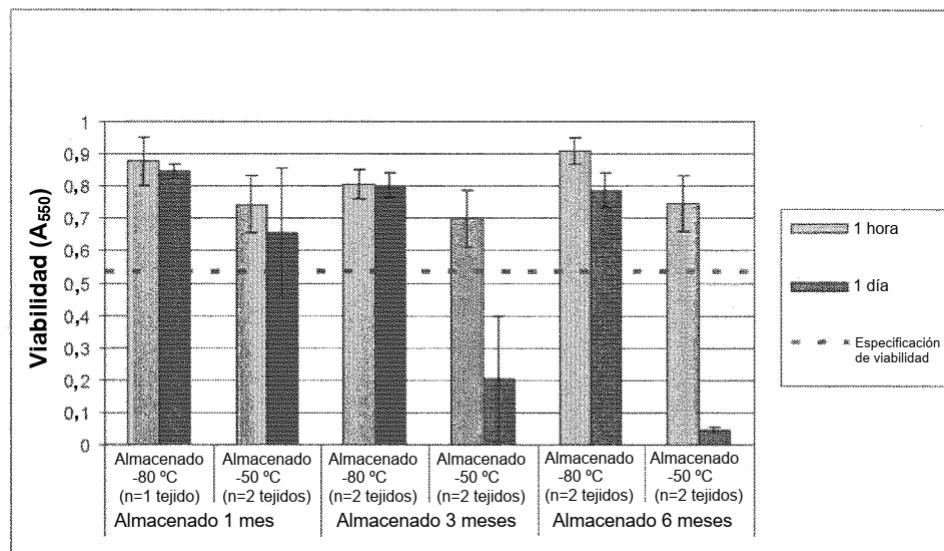


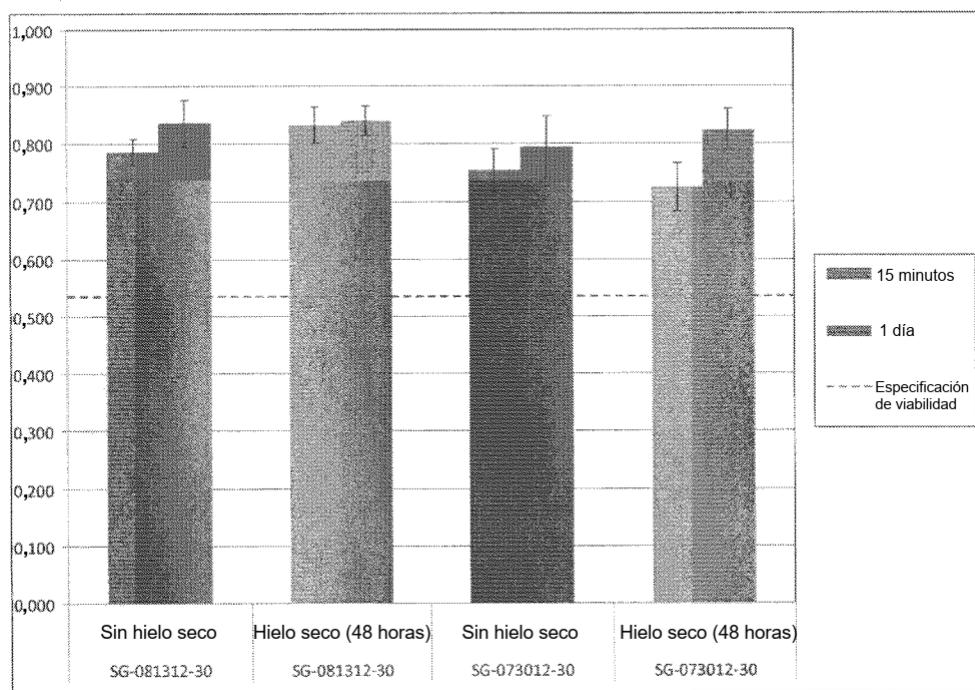
Figura 4

Figura 5

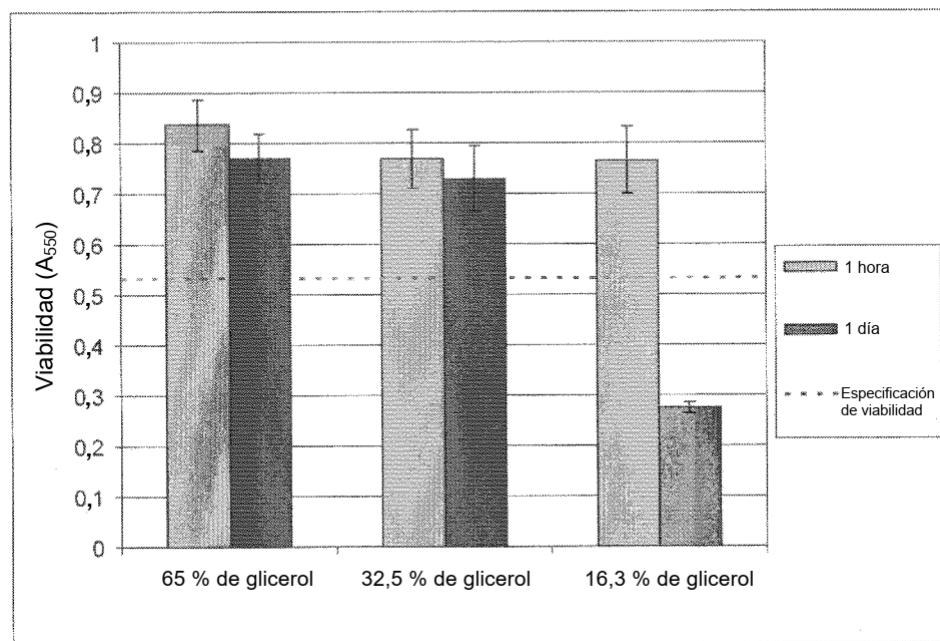


Figura 6

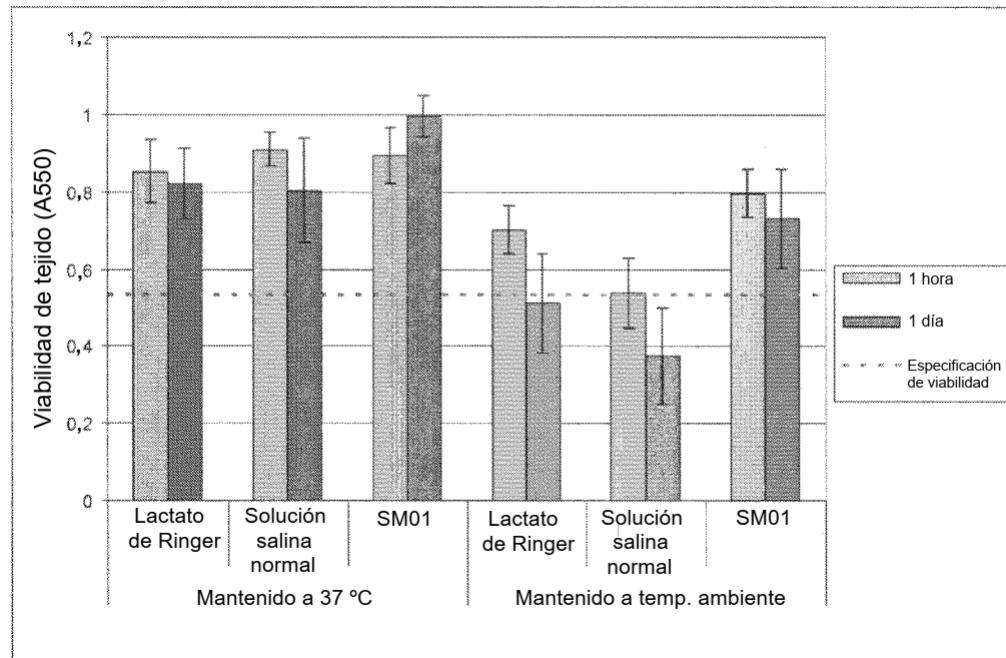


Figura 7

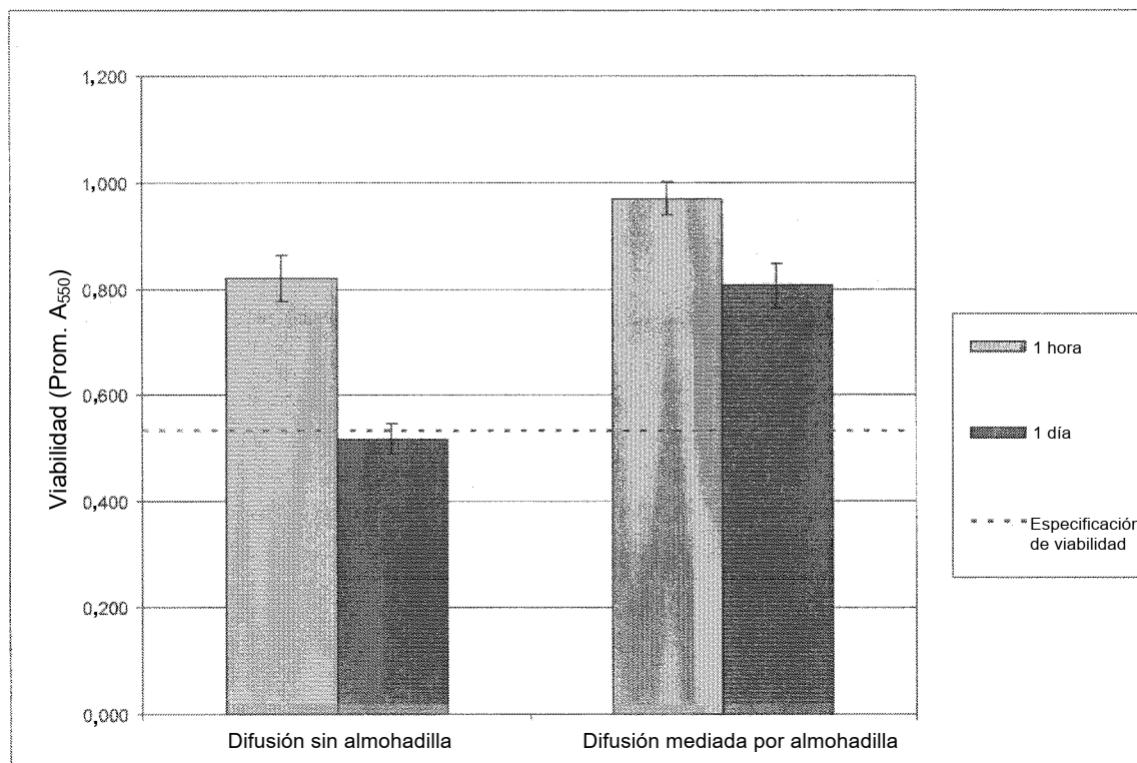


Figura 8

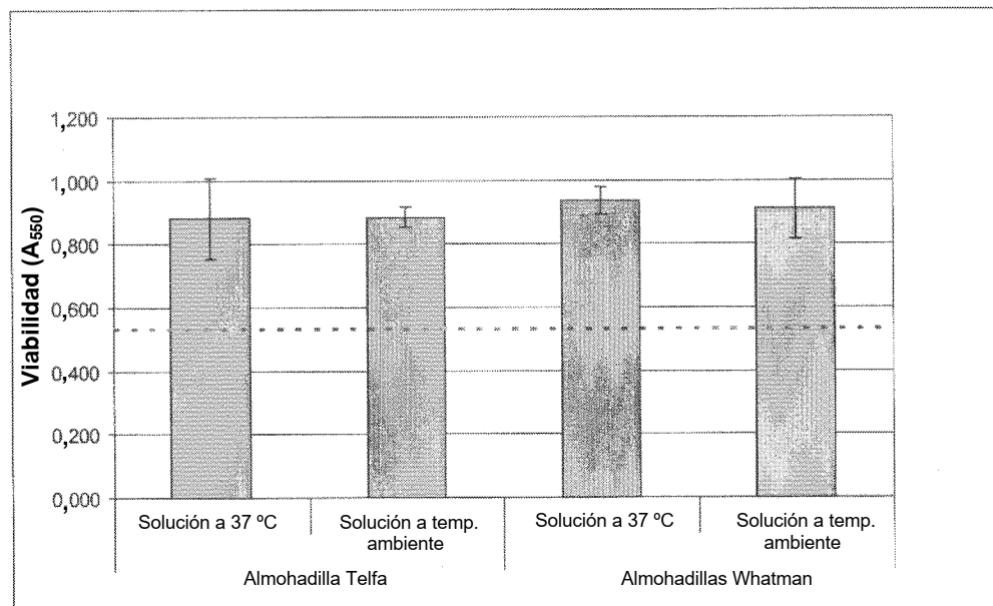


Figura 9

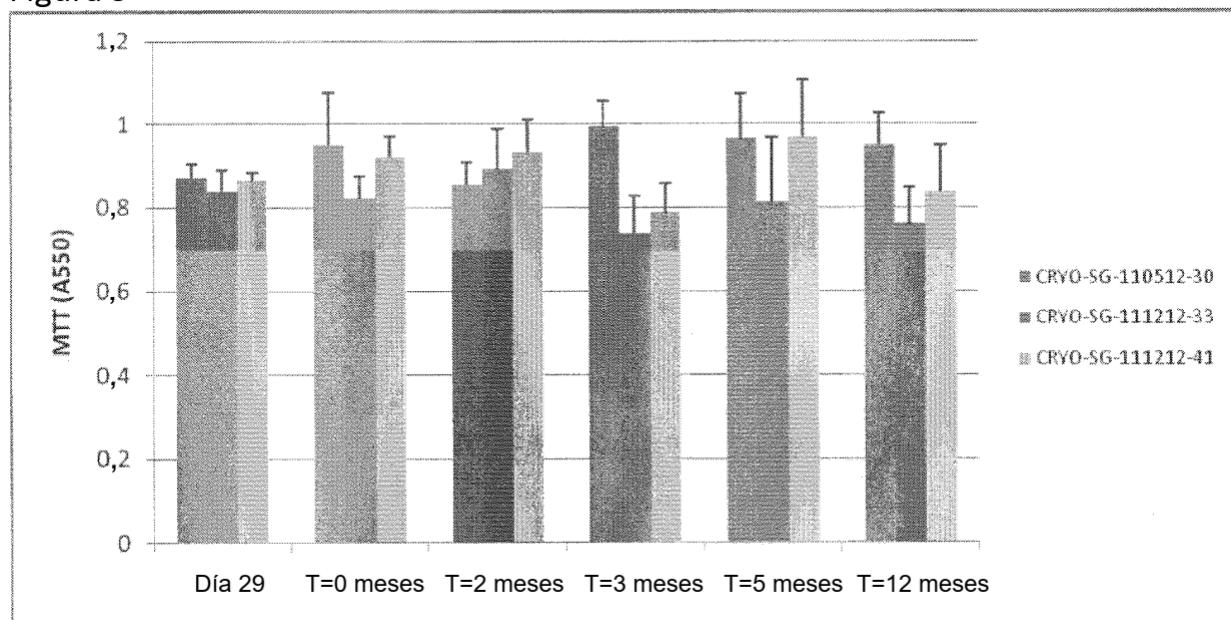


Figura 10

