(19) INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PORTUGAL

(11) *Número de Publicação:* **PT 644929 E**

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12N005/00 A A61K035/00 B
C12N005/10 B A61K048/00 B
C12N015/86 B A61M037/00 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) *Data de depósito:* 1993.06.11

(30) *Prioridade:* 1992.06.11 US 897357

(43) *Data de publicação do pedido:* 1995.03.29

(45) *Data e BPI da concessão:* 2000.08.16

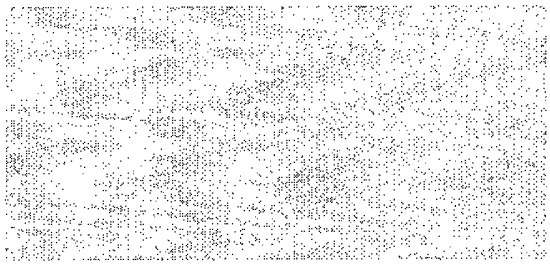
(73) *Titular(es):*
APPLIED TISSUE TECHNOLOGIES LLC
70 WALNUT STREET, WELLESLEY, MASSACHUSETTS 02481 US

(72) *Inventor(es):*
ELOF ERIKSSON US
PETER M. VOGT DE

(74) *Mandatário(s):*
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* SISTEMA E MÉTODO PARA O TRANSPLANTE DE CÉLULAS

(57) *Resumo:*



DESCRIÇÃO

"Sistema e método para o transplante de células"

Antecedentes do invento

O invento refere-se à utilização de material genético exógeno, para a produção de um medicamento para utilização num método de manipulação genética de células *in vivo*.

Os queratinócitos são as principais células que cobrem a superfície do corpo. Eles são capazes de produzir proteínas, particularmente queratina, que constitui a principal barreira de superfície do corpo. Por diversas razões, os queratinócitos são alvos potencialmente atractivos para a transferência de genes. Uma vez que estão localizados na superfície do corpo, são de fácil acesso para manipulação genética e monitorização. No caso de surgirem complicações da transferência de genes, por exemplo, desenvolvimento de tumores locais ou infecções locais, estes poderiam ser mais facilmente tratado na pele do que noutro local.

Até agora, a manipulação genética dos queratinócitos tem sido feita de um modo principal. Tem-se recolhido pele, separado os queratinócitos dos fibroblastos e em seguida isolado os queratinócitos individualmente, colocando-os em suspensão. Tem-se feito a cultura destas suspensões de queratinócitos até à confluência, utilizando técnicas de cultura de tecidos, como descrito por Rheinwald, J.G., Green, H., *"Serial Cultivation of Human Epidermal Keranocytes: The formation of keratinizing Colonies From Cells"*, Cell G, 331-343, 1975.

O novo material genético tem sido introduzido no queratinócito, ao mesmo tempo que crescido *in vitro*, utilizando ou um vector viral ou um plasmídeo, como descrito por Morgan, J.R., Barrandon, Y. Green, H., Mulligan, R.C., *"Expression of an Exogenous Growth Hormone Glue by Transplantable Human Epidermal Cells"*, Science, Vol. 237, 1476-1479 (1987) e Tenmer, J., Lindahl, A., Green, H., *"Human Growth Hormone in the Blood of Athymic Mice Grafted With Cultures of Hormone-Secreting Human keranocytes"*, FASEB J., 4:3245-3250 (1990). As células transfectadas são então normalmente ressuspensas e crescidas em meio selectivo, de modo a aumentar o rendimento da transfecção. Faz-se então o transplante de lâminas de queratinócitos de novo no animal de onde os queratinócitos foram recolhidos.

Mesmo que o rendimento *in vitro* tenha sido aceitável, o rendimento *in vivo* tem sido inaceitavelmente baixo, quer a curto quer a longo prazo. Tem sido muito difícil documentar

qualquer expressão a longo prazo (mais de trinta dias) significativa, com estas técnicas, por exemplo, como descrito por Garlick, J.A., Katz, A.B., Fenvjes Esitaichman, L.B., *"Retrovirus Mediated Transduction of Cultured Epidermal Keranocytes"*, J. Invest. Dermatol., 97:824-829, 1991.

O invento procura assim melhorar os métodos para transplantar, num paciente, células manipuladas geneticamente, especialmente queratinócitos.

O presente invento pretende ainda proporcionar um meio para o transplante que seja económico, prático, facilmente produzido e adequado ao paciente, com um esforço e custo mínimos.

Resumo do invento

O presente invento proporciona a utilização de material genético exógeno para a produção de um medicamento para utilização num método de manipular geneticamente células *in vivo*, num paciente, por introdução de material genético exógeno nas células a ser manipuladas, em que se liga uma câmara formada por um material impermeável a gases e humidade, flexível, num local num paciente, em que se pretende manipular as células, em que a câmara é aberta para as células a ser manipuladas e contém um meio fluido adequado para a cultura de células.

O invento tem também utilidade na produção de um medicamento de material genético exógeno, em combinação com uma câmara para cultura de células *in vivo* num local, num paciente, câmara essa que é formada por um material impermeável a gases e humidade, flexível, e compreende uma abertura que pode segurar-se na periferia da pele do paciente, sendo a combinação utilizada para produzir um medicamento para utilização num método para manipular geneticamente células *in vivo* num paciente, por introdução de material exógeno nas células a ser manipuladas, em que a câmara é ligada num local do paciente onde se pretende manipular as células, contendo a câmara um meio fluido adequado para a cultura das células, sendo a mesma aberta para as células a ser manipuladas.

A transferência genética de material genético com vectores virais, plasmídeos ou canhões de genes em queratinócitos, especialmente os que incluem uma grande percentagem de hemocitoblastos epidérmicos, em combinação com a utilização de uma câmara de cultura *in vivo*, demonstrou ser particularmente eficaz para a cultura de queratinócitos.

Utilizando o sistema de câmara de ferida, a transferência de genes directa *in vivo* pode ser feita nas células expostas de uma ferida aberta. Se estas células não forem cobertas pela câmara, elas secam e morrem. A câmara também sela completamente a ferida ao exterior, eliminando o espalhamento do material genético e vectores para locais fora da ferida. Ao mesmo tempo, a câmara impede a introdução acidental de contaminações indesejadas, incluindo vírus e outros microorganismos e contaminantes químicos na ferida.

A utilização dos sistema de câmara de ferida para a transferência de genes permite também, de forma não invasiva, avaliar o sucesso da transferência, testando a presença da proteína expressa no fluido da ferida, em contraste com a arte anterior em que se utilizavam técnicas invasivas, como as biópsias, de modo a obter-se a mesma avaliação de uma expressão inicial.

Os hemocitoblastos da pele que estão localizados nos folículos pilosos e na camada basal da pele são utilizados para aumentar grandemente a sobrevivência a longo prazo. Podem-se utilizar outras células, especialmente os queratinócitos, isolados ou em combinação com os hemocitoblastos.

Podem ser expressos uma grande variedade de proteínas e materiais, quer para secreção no sistema sanguíneo e linfático geral, quer para alterar as propriedades da proteína, por exemplo, para não expressar proteínas que desencadeiem uma resposta imunitária contra a célula transplantada.

Descrição sumária das figuras

A Figura 1 é um esquema da superfície interior exposta de uma fatia de pele de espessura parcial, utilizada para expor os folículos pilosos, para obter hemocitoblastos epidérmicos.

A Figura 2 é uma vista em perspectiva de uma forma de concretização preferida de uma câmara para cultura de queratinócitos num paciente.

A Figura 3 é uma vista em perspectiva de uma forma de concretização de uma câmara de cultura de queratinócitos.

A figura 4 é uma representação esquemática de um dispositivo de tatuagem, para fornecimento de material genético às células.

A Figura 5 é um corte transversal de uma microagulha 10, apresentada na Figura 4.

A Figura 6 é uma fotografia que mostra a inserção de material genético em células da epiderme, utilizando um dispositivo de tatuagem.

A Figura 7 é também uma fotografia que mostra a inserção de material genético em células da epiderme, utilizando um dispositivo de tatuagem.

A Figura 8 é uma fotografia de um corte histológico que mostra queratinócitos em que foi inserido material genético, utilizando o dispositivo de tatuagem.

A Figura 9 é uma fotografia de um corte histológico que mostra queratinócitos em que foi inserido material genético, utilizando o dispositivo de tatuagem.

A Figura 10 é uma fotografia de um corte histológico que mostra queratinócitos em que foi inserido material genético, utilizando o dispositivo de tatuagem.

A Figura 11 é um gráfico que mostra a expressão do gene que codifica para a hormona de crescimento humana em queratinócitos, ng/ml *versus* tempo, em dias.

A Figura 12a é uma fotografia de uma transfecção de alta frequência com o gene lacZ, células positivas para β-Gal, de queratinócitos primários de porco, por transferência de genes retroviral. A Figura 12b é uma fotografia da expressão do gene lacZ no epitélio regenerado de uma ferida de espessura total reconstituída por queratinócitos transplantados, transfectados retroviralmente, coloração para β-Gal.

A Figura 13 é um gráfico da perda de proteína para o fluido da ferida (mg/dl) ao longo do tempo (dias), comparando o efluxo de proteína endógena de feridas de espessura total em seis porcos para tratamento com solução salina normal (-quadrados-) versus suspensões de queratinócitos (...triângulos...), aplicadas às feridas em câmaras de tratamento.

A Figura 14a é um gráfico que mostra a produção contínua da hormona de crescimento humana (hGH) (ng/ml) ao longo do tempo (dias) *in vitro*, por cultura primária de queratinócitos de porcino após transferência de genes retroviral, e é uma média das duas experiências. A Figura 14b é um gráfico que mostra a hormona de crescimento (hGH) (ng/ml) ao longo do tempo (dias) *in vivo* no fluido de feridas de espessura total, produzida por suspensões de queratinócitos de porcino transplantados após transferência retroviral de

genes. Após a re-epitelização completa (histologicamente, dia 6) e formação de uma monocamada de epitélio, os valores retornam à linha de base. Média ± EP (n=10).

Descrição pormenorizada do invento

A patente U.S. 5,152,757 descreve um sistema de tratamento para feridas e outras desordens da pele, incluindo uma câmara que pode segurar-se em torno da periferia de uma ferida, com meios de abertura para introdução na, e remoção de fluidos de tratamento da, câmara, fluido de tratamento, pelo menos um aditivo de tratamento, meios de controlo para variáveis de tratamento e meios de monitorização para monitorizar as condições da ferida. O fluido e aditivos de tratamento são seleccionados de acordo com as indicações da ferida e incluem factores de crescimento, antibióticos, anestésicos, enzimas e oxigénio. As variáveis de tratamento, como a temperatura, pressão osmótica coloidal, pH, concentração iónica e teor de oxigénio são controladas de acordo com as indicações da ferida.

A câmara é fixada em torno da periferia de uma ferida, introduz-se um fluido de tratamento e pelo menos um aditivo de tratamento na câmara e as variáveis de tratamento são controladas de acordo com as condições da ferida. Exemplos de desordens que podem ser tratadas incluem queimaduras, dores, tumores e infecções. A câmara pode também ser utilizada para fazer a cultura de células nas feridas, em que se introduzem células dispersas na câmara e se deixam assentar e crescer num local da ferida.

O método aqui descrito baseia-se em dois componentes principais. Um é tornar hemocitoblastos epidérmicos alvos para a transferência de genes. O segundo é a utilização da câmara de ferida de modo a criar um ambiente de cultura de tecido *in vivo*, que elimina a necessidade de fazer a cultura de células *in vitro* quando se introduz o material genético nas células.

Os queratinócitos da epiderme são idealmente adequados para a transferência de genes e expressão recombinante de ADN na cura de feridas epidérmicas, devido às suas funções-chave na estabilidade mecânica e integridade e na secreção de substâncias biologicamente activas, como a apolipoproteína A, que são detectáveis na circulação sanguínea sistémica. Demonstrou-se que as suspensões de queratinócitos geneticamente manipulados podem ser transplantadas em feridas abertas, o que elimina a necessidade de as crescer até formarem lâminas. Isto faz com que o processo para a transferência de genes nos queratinócitos seja muito mais fácil e menos demorado.

Células

Os queratinócitos são separados da derme com dispase e em seguida individualmente separados com tripsina, removendo-se os fibroblastos. Tomando como alvo os queratinócitos dos folículos piloso, o que proporciona um número elevado de hemocitoblastos, verificou-se que o rendimento de transfecção é maior e que estas células são incorporadas de forma estável na camada basal da epiderme. As células dos folículos pilosos servem como "hemocitoblastos da epiderme". Utilizando uma separação mecânica do resto da epiderme desta área, estas células podem ou ser removidas utilizando uma técnica de dermatoma, ou o material genético pode ser directamente introduzido nestas células *in situ*.

As células podem ser obtidas como necessário a partir de outros locais no paciente, incluindo outros tecidos, por exemplo, células de medula óssea, células musculares e células de órgãos endócrinos.

Introdução de material genético

O material genético pode ser introduzido nas células por transferência com plasmídeo, retroviral, ou por canhão de genes, utilizando técnicas convencionais. O material genético irá codificar para proteínas, tais como factores de crescimento, hormonas e outras proteínas terapêuticas. Estas irão acelerar a cura das feridas e corrigir algumas deficiências, como deficiências da paratiróide, hormona do crescimento e outras deficiências hormonais, bem como deficiências de alguns factores de coagulação, como o factor VIII. As células podem também ser manipuladas para não expressar uma proteína, tal como uma proteína envolvida numa resposta imunitária, por exemplo um antigénio de leucócitos humanos (HLA).

Os queratinócitos são recolhidos, obtém-se uma suspensão por exposição a enzimas, primeiro a dispase e em seguida a tripsina, em seguida são crescidos até à sub-confluência num incubador. Introduz-se então ADN recombinante na célula, utilizando um vector viral, plasmídeo ou a técnica de canhão de genes. Em seguida, os queratinócitos são suspensos e injectados em feridas de espessura total, que são cobertas por uma câmara de ferida. Estes queratinócitos irão não só sobreviver, como irão mostrar a presença contínua de células que expressam o marcador genético na camada basal da epiderme.

Os queratinócitos e fibroblastos na ferida podem ser induzidos a produzir, por exemplo, factores de crescimento, se o gene que codifica para o factor de crescimento for introduzido no genoma ou citoplasma destas células. O factor de crescimento expresso irá

não só aumentar a velocidade de cura da ferida, como também ajudar a sarar feridas que não se curariam de outra forma. Os queratinócitos geneticamente manipulados podem portanto ser utilizados para fornecer factores de crescimento à ferida, de um modo que é determinado pelo próprio ambiente da ferida.

Esta aproximação pode ser utilizada para inserir outros genes de interesse nos queratinócitos, de modo a restituir as funções defeituosas numa variedade de doenças de pele. Além disso, o modo pelo qual as citóquinas actuam pode ser alterado, na medida em que um factor é expresso numa célula que normalmente não produz esse factor, convertendo assim uma via parácrina numa via autócrina. Podem-se semear queratinócitos manipulados geneticamente em vez das células nativas e estas podem segregar proteínas novas na ferida, durante o processo de cura. Do mesmo modo, os queratinócitos podem ser geneticamente manipulados para reparar defeitos genéticos inerentes, como a epidermólise ampolar. Estas células podem então ser semeadas na ferida excisional superficial, para produzir uma nova epiderme com as características desejadas. As feridas problemáticas requerem a cobertura do defeito e uma cura rápida.

Utiliza-se o seguinte protocolo para a transferência directa de genes *in vivo*, de modo a alcançar a expressão sistémica do gene transferido.

Os hemocitoblastos localizados nos folículos pilosos, profundamente até à junção epidérmica-dérmica são expostos criando uma fatia de epiderme, em que a porção mais funda da fatia contém a camada basal da epiderme. A superfície da ferida exposta contém a porção de folículos pilosos com os queratinócitos hemocitoblastos. O material genético é então introduzido com um canhão de genes (ACCELL™, Dr. Dennis McCabe, 1986) e em seguida recuperado na câmara da ferida. Alternativamente, a ferida com a superfície inferior da fatia exposta (veja-se Figura 1) é exposta na câmara da ferida e o gene, num vector adequado para transferência viral ou transferência de plasmídeo, é introduzido na câmara. A expressão inicial do gene é testada em amostras deste fluido da câmara às 24 e 48 horas. Em seguida, a fatia epidérmica é suturada de novo no lugar e a ferida é selada com um penso.

A câmara

Na forma de concretização preferida, faz-se a cultura das células num sistema que inclui uma câmara, fluido de tratamento (que pode ser um meio nutriente, solução salina fisiológica ou alguma outra solução compatível), aditivos de tratamento (como antibióticos e agentes tamponantes), meios para controlar as variáveis de tratamento e meios para monitorizar o crescimento celular.

A câmara de ferida, que é feita de vinilo ou outro material transparente flexível, como o poliuretano, tem a forma de um fole e uma abertura que corresponde ao tamanho da ferida, quer seja uma ferida crónica ou uma ferida superficial criada especificamente para fins de transferência de genes. A câmara contém uma pequena porção de solução salina normal com agentes anti-microbianos. Quando se utilizam vectores de plasmídeo ou retrovirais, as câmaras são simplesmente ligadas em cima da ferida e o vector é injectado para a câmara, sendo a câmara selada de novo. Quando se utiliza o canhão de genes, o ADN é fornecido à célula e a câmara, com solução salina normal e antibióticos, é então ligada ao perímetro da ferida. O fluido da ferida é recolhido de modo a testar a expressão do produto secretável do gene (factor de crescimento) às 24 e 48 horas. A ferida é tratada na câmara até estar sarada.

A câmara engloba uma área de superfície pré-determinada no local da cultura. A câmara proporciona protecção à ferida do ambiente envolvente, não estéril, variáveis controlo e de tratamento, retenção para um tratamento fluido contínuo, um sistema de fornecimento eficaz para aditivos, monitorização directa do crescimento celular. A monitorização pode ser realizada visualmente, se a câmara for fabricada num material transparente, ou por extracção e análise do fluido da câmara. O fluido extraído do sistema pode ser analisado quanto a factores que proporcionam uma indicação do estado de cura, bem como quanto à presença de componentes indesejados, como microorganismos, níveis baixos de oxigénio, níveis elevados de dióxido de carbono e pH adverso. O fluido pode ser testado quanto ao número e tipo de bactérias e outros microorganismos, o número e tipo de células, a quantidade e tipo de proteínas segregadas pelo paciente e as células dentro da câmara e outros factores como níveis de medicamentos, oxigénio, dióxido de carbono e pH.

O sistema de tratamento proporciona um controlo sobre variáveis, incluindo a temperatura, concentração iónica específica, pressão osmótica coloidal, concentração de glucose, teor em aminoácidos, concentração de gordura, concentração de oxigénio e concentração de dióxido de carbono e pH.

A porta proporciona um acesso para a introdução de fluidos de tratamento e aditivos de tratamento na câmara e extracção de fluidos da câmara. Nalgumas formas de concretização, como as apresentadas na Figura 2, o fluido de tratamento é introduzido na câmara por injecção com uma seringa hipodérmica convencional, através da parede da câmara, de preferência fabricada num plástico flexível, auto-reparador. Noutras formas de concretização, como as apresentadas na Figura 3, a câmara tem uma porta de entrada e saída, ou uma porta de entrada e uma porta de saída, separadas. São necessários mecanismos de válvulas quando o aparelho não vai ser ligado a um reservatório de fluido de tratamento e

um dreno, ou ligado a um sistema de perfusão contínuo. A selagem das portas seria quebrada a um tempo adequado, para ligação de outro aparelho, tal como um sistema de perfusão contínuo, num hospital, por exemplo.

Uma concretização preferida do sistema de tratamento incorpora perfusão contínua do fluido de tratamento através das portas de entrada e saída. Pode-se utilizar uma bomba ou a gravidade, para mover o fluido de tratamento. O fluido de tratamento pode ser recirculado após filtração e outra acção adequada (*e.g.* aquecimento ou arrefecimento). Em alternativa, pode-se introduzir fluido de tratamento fresco e eliminar o fluido contaminado. Numa concretização descrita na patente U.S. 5,152,757, a câmara contém um reservatório ou mais que uma câmara, em que a câmara adicional serve como fonte de meio de cultura fresco, oxigénio e aditivos de tratamento.

A Figura 2a e b mostra uma forma de concretização preferida de uma câmara 10, sendo a Figura 2a uma vista de topo e a Figura 2b uma vista lateral. A câmara 10 tem uma construção em forma de fole que impede que a maioria da câmara contacte com a área da ferida e actua, de facto, de modo a empurrar a câmara para longe da ferida. A câmara 10 é construída de preferência em vinilo transparente, ou outro material impermeável a gases e humidade, esterilizável, flexível, selável pelo calor. A prega do fole 12 permite uma grande capacidade para o fluido de tratamento, bem como facilidade de construção. Para a construção, uma base anelar 14 é fundida pelo calor ou por ultra-sons a uma peça anelar da prega do fole 12, e um topo circular 16 é fundido a uma peça da prega do fole 12. O topo circular 16 é um material substancialmente transparente. Os restantes componentes não são necessariamente transparentes, mas poderão sê-lo. Uma base anelar transparente pode facilitar a inspecção visual de perdas. Proporciona-se uma abertura 18 na base anelar 14, que corresponde em tamanho à ferida ou local para transplante. O lado de baixo 15 da base anelar 14 contém uma fita adesiva ou revestimento, adequado para fixar a câmara à pele.

Tal como será facilmente reconhecido pelos peritos na arte, é desejável um invólucro amovível para proteger o adesivo e manter a esterilidade do interior da câmara. As câmaras podem ser armazenadas num pacote estéril, durante anos. Esta câmara pode ter muitas formas, de modo a ajustar-se a feridas desde o tamanho de um centímetro quadrado, até ao tamanho de uma extremidade completa. É importante que a superfície adesiva seja suficiente para segurar o penso à superfície da pele, de modo a assegurar um selo à prova de perdas.

Tal como anteriormente referido, a introdução do fluido de tratamento e de um aditivo de tratamento e a extracção subsequente podem ser conseguidas directamente, através das paredes da câmara, por meio de uma agulha e seringa. Contempla-se a utilização

de uma material auto-reparador para construir a câmara 10. Um método alternativo seria a utilização de portas de entrada e saída que permitem a introdução e extracção de várias substâncias na câmara.

A Figura 3 é uma vista de uma câmara 20 para englobar uma área de superfície pré-determinada em torno de um local, num paciente em que se pretende fazer a cultura de células, sendo a câmara aberta para a pele 24 e selada nas extremidades 26 com a superfície da pele, em torno da ferida, por meio de um adesivo. A câmara 20 tem uma secção transparente 22 para monitorização visual da ferida, portas 28, 29 para introdução de fluido de tratamento e aditivos de tratamento na câmara e extracção de fluido da câmara protectora e meios de monitorização (não apresentados) para analisar o fluido extraído quanto a variáveis pré-determinadas e condições da ferida.

Introdução directa de material genético em queratinócitos

Também se pode utilizar um híbrido entre a tatuagem e a microinjecção, para inserir material de ADN directamente nas células. Tal como apresentado na Figura 4, várias microagulhas 10 estão montadas em fila num suporte. As microagulhas 10 são pontiagudas e ocas, como mostra a Figura 5. A solução que contém material genético, de preferência ADN, é colocada na superfície da epiderme. As agulhas 10 são movidas como um grupo através da pele para "injectar" e, portanto, fornecer o material genético através da superfície da pele à camada de epiderme subjacente, ao longo de várias linhas paralelas. As microagulhas, tais como agulhas de tatuagem, são ideais para este fim. De preferência, as agulhas são utilizadas para fornecer micropartículas com material de ADN a elas ligado, como mostrado nas Figuras 6-10.

Alternativamente, liga-se uma fila de microagulhas a um dispensador central que contém uma solução de micropartículas, às quais o material de ADN é ligado e a solução é injectada em células de pele, tais como queratinócitos. Além disso, esta técnica é útil para fornecer uma suspensão de material de ADN isolado, sem ligação a micropartículas.

Este sistema, ligado a um aparelho de varrimento, pode cobrir de forma sistemática uma área específica de pele ou outro tecido, e depositar o material de ADN de forma uniforme num grande número de células, na área pré-definida.

Este método de introdução de material genético nos queratinócitos pode ser superior à transdução de genes utilizando vectores plasmídeos ou retrovirais, pois estes últimos têm um rendimento inaceitavelmente baixo. A transferência de material genético com partículas

aceleradas, utilizando "canhões de genes", tem um rendimento maior do que a transdução com plasmídeos ou retroviral, mas tem outras desvantagens, como uma explosão muito forte e o risco de uma descarga acidental.

Esta técnica combinada de tatuagem e microinjecção de material genético nas células, com microagulhas oscilatórias, proporciona um método prático, de custo suportável e também previsível, de inserção nas células de material de ADN para expressão sistémica.

Preparação do local para cultura de células

O local para cultura de células é preparado removendo a pele infectada ou queimada, se necessário, ou criando uma ferida adequada para transplante de células manipuladas. A pele adjacente à ferida é então limpa, de modo a que haja uma boa adesão entre a câmara e a pele. A porção aberta da câmara é então colocada sobre o local, em que as extremidades adesivas seguram a câmara à pele, introduzindo-se em seguida um meio de cultura adequado e células na câmara selada. O fluido de tratamento pode ser introduzido e em seguida extraído, a favor de um meio de cultura fresco, num processo contínuo, ou em lotes. Os aditivos de tratamento seleccionados podem ser introduzidos na câmara de forma contínua ou a um tempo pré-determinado ou a intervalos periódicos. Também se efectua o controlo adequado das variáveis de tratamento. A monitorização é conseguida por avaliação do paciente e avaliação visual do fluido dentro da câmara e da própria ferida. Além disso, as amostras de fluido são extraídas da câmara para análise e diagnóstico. A câmara é removida quando a ferida estiver sarada de forma suficiente.

Por exemplo, para determinar se a ferida está ou não sarada, analisa-se o conteúdo proteico do fluido extraído. Quando o conteúdo proteico do fluido extraído decresce até ao nível existente em câmaras que contêm fluido, colocadas sobre pele normal, a ferida está sarada. Os métodos para determinar o conteúdo de proteína são bem conhecidos na arte e são pouco dispendiosos e rápidos. Os tipos de proteína e quantidades relativas de tipos de proteínas também podem ser determinados para avaliar também a cura e a expressão de material genético exógeno.

Controlo de variáveis de tratamento ou de cultura

O tratamento de cada paciente é específico para as condições dentro da câmara. O controlo das variáveis de tratamento pode incluir um arrefecimento contínuo a 34°C durante as primeiras 24 horas. A monitorização pode incluir a análise do fluido extraído, quanto a proteínas e microorganismos, extraindo-se amostras a cada 24 horas. Por exemplo, quando o

número de microorganismos é inferior a 10 à quarta por mililitro ou por cc, a infecção foi resolvida. Os níveis de proteína verificados todos os dias deverão ser inferiores a 24 $mg/dl/cm^2$.

Tal como acima referido, há várias variáveis de tratamento que podem ser controladas pelo sistema. Uma destas variáveis de tratamento que pode ser controlada é a temperatura. Verificou-se que o aquecimento da ferida, de uma temperatura de aproximadamente 27°C (uma temperatura comum para uma ferida de uma extremidade inferior) para 37°C, acelera a cura da ferida. Os dados experimentais mostraram que a uma temperatura de aproximadamente 37°C, a velocidade de cura da ferida é mais de duas vezes mais rápida do que a uma temperatura de 27°C. A temperatura da área da ferida pode ser obtida por aquecimento do fluido de tratamento. Também se verificou ser benéfico o arrefecimento no caso de uma queimadura aguda e outras feridas traumáticas. O arrefecimento reduz a dor, o inchaço e a destruição do tecido. Em termos gerais, as feridas agudas beneficiam do arrefecimento durante as primeiras horas após a ferida ocorrer e, mais tarde, as feridas beneficiam de uma temperatura de aproximadamente 37°C. O arrefecimento pode ser efectuado, igualmente, por arrefecimento do fluido de tratamento.

Também se podem optimizar outras variáveis de tratamento. Por exemplo, as concentrações iónicas deverão ser mantidas próximo dos níveis iónicos extracelulares. As concentrações de glucose, aminoácidos e gorduras deverão ser mantidas próximo das concentrações presentes no plasma, ou ser correspondentes a um meio de cultura de tecidos de pele. As concentrações de oxigénio e dióxido de carbono deverão ser mantidas nos seus níveis tecidulares normais. O oxigénio é um aditivo de tratamento importante, e é essencial para o crescimento celular.

Aditivos de tratamento e meios de cultura

A solução salina normal ou fisiológica é o meio de cultura básico. Pode-se adicionar ao meio de cultura/tratamento agentes tamponantes, anestésicos, como a lidocaína, antibióticos, como a penicilina ou estreptomicina, agentes quimioterapêuticos e factores de crescimento, incluindo o factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crescimento semelhante a insulina (IGF), factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e toxina da cólera (CT). Também se podem introduzir na câmara, como aditivos do tratamento, meios de cultura de tecidos e fluidos com pressão osmótica elevada e acessibilidade ao oxigénio.

A selecção dos aditivos do tratamento é específica da ferida. Por exemplo, se foi diagnosticada uma infecção, adicionam-se antibióticos na quantidade de uma dose única parentérica por 1000 cc de fluido. Além disso, um aditivo de tratamento de gentamicina, tobramicina ou carbenicilina é adequado para uma ferida infectada com *Pseudomonas*, detectada por análise do fluido extraído. Quando se diagnostica hipoxia, o líquido é passado através de uma câmara de oxigenação antes de entrar na câmara. Quando se diagnostica um tumor, é dada quimioterapia, numa quantidade de uma dose parentérica única por 1000 cc de fluido. Em situações que envolvem uma ferida contendo tecido necrótico e restos celulares, adiciona-se uma enzima proteolítica ao líquido. Adicionam-se imunomoduladores ao fluido de tratamento, quando se observa uma reacção inflamatória. Adiciona-se factor de crescimento epidérmico numa concentração de 10 nanogramas por cc, quando necessário.

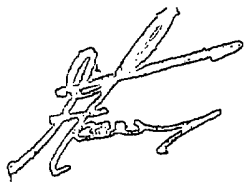
O presente invento será melhor compreendido com referência aos exemplos seguintes, não limitantes.

Exemplo 1: Transfecção de queratinócitos e expressão da hormona de crescimento humana em cultura e após transplante em feridas de espessura parcial

Na primeira série de experiências, recolheram-se os queratinócitos, plaquearam-se em frascos de cultura e transfectaram-se com uma técnica de vector viral, utilizando o método de Wilson, J.M., Biriuyi, L.U., Salomon, R.U., *et al.*, *"Transplantation of Vascular Grafts Lined with Genetically Modified Endothelial Cells"*, Science, 244: 1344-1346 (1980) ou uma técnica de transferência de plasmídeo, como descrito por Felgner, P.L., Galik, T.R., Holmer *et al.*, *"Lipofection: An Efficient, Lipid Mediated DNA-Transfection Procedures"*, Proc. Natl. Acad. Sci., 84: 7413-7417 (1987), cujos ensinamentos são aqui incorporados.

Os porcos são o animal modelo para a extrapolação para a pele humana, pois a pele de porcino assemelha-se à pele humana em vários aspectos, incluindo o tempo de renovação.

Especificamente, recolheram-se queratinócitos de dois porcos Yorkshire fêmea por excisão de uma espessura parcial de pele, separação da epiderme com dispase (0,25% de dispase, 2-3 h a 37°C), tripsinização (0,1% tripsina, 0,02% de EDTA, 30 min a 37°C) e particulação até uma suspensão de células unitárias. Estas foram crescidas até à sub-confluência (60-70%) e incubadas com um vector retroviral de leucemia de murídeo Moloney, defeituoso na replicação. A sequência de ADN para hGH foi inserida no genoma viral e estava sob o controlo do promotor das repetições terminais longas (LTR's). Os queratinócitos infectados foram tripsinizados, ressuspensos em solução salina contendo penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 μg/ml). Foram transplantados em feridas de



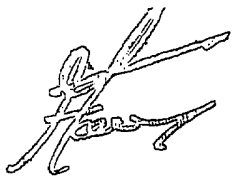
espessura total, produzidas no dorso (n=10), de um modo autólogo. As feridas de espessura total semeadas com queratinócitos não modificados (n=10) e solução salina (n=10), servem como controlo. Todas as feridas foram cobertas com câmaras de vinilo estéreis, para manutenção de um ambiente líquido nas feridas, ao longo do estudo. A presença de hGH no meio de cultura foi determinada por radioimunoensaio.

Utilizou-se a mesma metodologia com o gene lacZ, um gene marcador intracelular.

Observou-se uma expressão significativa de ambos os genes neste sistema, como se mostra nas Figuras 11 e 12a e b. As secções histológicas de pele mostraram que os queratinócitos que tinham o gene marcador lacZ não estavam incorporadas de forma estável na camada basal, mas migravam para a superfície, onde eram perdidas no estrato córneo. Ao analisar as razões para este facto, concluiu-se que a separação, por dispase, da derme e da epiderme não permitia a recolha de uma quantidade suficiente de hemocitoblastos. Uma outra razão era a de que o trauma repetido da recolha de hemocitoblastos, exposição do tecido a meio de cultura com níveis relativamente elevados de cálcio e o dano celular pelo meio viral ou de plasmídeo, originavam uma diferenciação quase terminal dos queratinócitos. Deste modo, os resultados foram grandemente melhorados utilizando uma maior percentagem de hemocitoblastos epidérmicos, obtidos a partir dos folículos pilosos e decrescendo a exposição ao cálcio e ao meio viral ou bacteriano.

Detectou-se hGH *in vitro* (meio de cultura) ao dia 4 após transfecção retroviral com uma produção média de 2,0 ng/ml. A produção de hGH *in vivo* (fluido da ferida) foi primeiro detectada 24 horas após o transplante (0,1 ng/ml) com um pico às 132 h (0,42 ng/ml) e retomou a linha de base ao dia 10. Os tempos de cura, determinados pelo teste de efluxo de proteínas no fluido da ferida, de feridas que receberam hGH-queratinócitos (12,1 ± 1,0 dias) não eram diferentes dos de feridas que receberam queratinócitos não infectados, mas eram significativamente mais curtos ($p<0,005$) do que os de feridas controlo não transplantadas (14,7 ± 0,6 dias). O transplante histológico de queratinócitos estabeleceu uma monocamada de epitélio logo ao dia 6 (os controlos tratados com solução salina, ao dia 11).

Os resultados demonstram que os queratinócitos autólogos que transportam o gene hGH irão continuar a expressar o gene hGH quando transplantado em feridas de espessura total. O hGH produzido não influencia os tempos de cura. Comparado com as culturas de queratinócitos *in vitro*, a produção de hGH *in vivo* é regulada de um modo dependente do tempo. Isto pode ser quer devido a uma regulação da expressão do gene hGH pelos queratinócitos durante a epitelização, perda da produção de hGH devido a uma diferenciação terminal, ou reacção de anticorpos à proteína estranha, como discutido por Selden *et al.*,



"Human Growth Hormone as a Reporter Gene in Regulation Studies Employing Transient Gene Expression", Mol. Cell. Biol. 6(9): 3173-3179 (1986). Uma vez que os queratinócitos manipulados geneticamente não só melhoram a re-epitelização de feridas de espessura total, mas também libertam um produto de ADN recombinante durante a cura, podem ser utilizados para fornecer e expressar péptidos terapêuticos, como os factores de crescimento, durante a cura da ferida. Utilizando um sistema de câmaras tópicas, a aplicação directa de células manipuladas geneticamente e a monitorização do produto genético podem ser facilitadas.

Exemplo 2: Cultura *in vivo* de queratinócitos geneticamente modificados

Transplantaram-se queratinócitos não modificados e transduzidos com retrovírus, que expressam o gene da β-galactosidase e o gene da hormona de crescimento humana (hGH), em feridas de pele fechadas, de porcos Yorkshire. As análises de amostras de pele sequenciais, obtidas por biópsia durante as quatro semanas após o transplante revelaram a sobrevivência das células transplantadas e a expressão de β-galactosidase. Os queratinócitos transfectados foram primeiro referidos nas porções profundas das feridas e em seguida na camada basal da epiderme regenerada. Estas células contribuíram para a arquitectura normal e função de barreira da pele e transferiram o novo produto genético para células em diferenciação terminal, do *stratum spinosum*. Quando os queratinócitos transduzidos com o gene hGH foram transplantados nas feridas, detectou-se hGH até 10 dias, no fluido da ferida. Pelo contrário, a produção de hGH *in vitro* foi continuamente detectada durante 47 dias. O padrão de expressão demonstra que os queratinócitos transduzidos reconstituem a nova epiderme e sofrem uma diferenciação terminal e poderiam ser utilizados para a introdução e expressão de proteínas terapêuticas na doença de pele, para promover a substituição da pele e a cura.

As feridas de porcino (queimaduras, incisões e excisões de espessura parcial e total) e as feridas humanas (crónicas, de espessura total) foram englobadas individualmente em câmaras de vinilo contendo fluido placebo com aditivos. Salvo especificação em contrário, o fluido placebo era NaCl 0,9% não tamponado, com 100 IU de penicilina/ml e 100 μg de estreptomicina/ml. Também se utilizaram vários meios para a cultura de queratinócitos. A manutenção do sistema da câmara ocorria duas vezes por dia, diariamente, em dias alternados ou continuamente. As feridas foram tratadas nas câmaras até estarem saradas. As feridas foram analisadas macroscopicamente, bioquimicamente (por análise do fluido da câmara) e microscopicamente. Tanto o fluido da ferida como o fluido da cultura *in vitro* da hormona de crescimento humana (hGH) foram determinados por radioimunoensaio Allegro™ (Nichols Institute Diagnostic, San Juan Capistrano, CA).

Inseriu-se o gene de β-galactosidase de *Escherichia coli* (lacZ) em queratinócitos de porcino, por transdução com um vector de leucemia de murídeo Moloney, em que o gene de β-galactosidase está sob o controlo da repetição terminal longa do retrovírus, como descrito por Danos *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 6560-6464 (1988). Transplantaram-se suspensões de queratinócitos nativos, ou transduzidos retroviralmente em feridas de pele de espessura total produzidas cirurgicamente, em 13 porcos Yorkshire fêmea, com uma câmara de vinilo, como um incubador *in vivo* temporário. A pele de porcino é semelhante à pele humana em vários aspectos (*e.g.* tempo de renovação) e constituía portanto o modelo mais adequado para este estudo. Utilizaram-se porcos Yorkshire fêmea, domésticos (3-4 meses de idade; 40-45 kg). As culturas primárias de queratinócitos foram estabelecidas a partir de enxertos de pele de espessura parcial (0,012" de espessura) retirados da região dorsal do pescoço dos porcos, sob anestesia geral por inalação. As secções foram incubadas em meio isento de soro contendo Dispase™ a 0,25%, a 37°C, durante 2 a 3 horas, para separar a epiderme da derme. Obteve-se uma única suspensão de células de queratinócitos, por incubação em tripsina 0,1% e EDTA 0,02% (37°C durante 30 minutos) e disrupção mecânica cuidadosa. A solução foi filtrada através de uma malha de 100 μm e ressuspensa em meio. As células foram então semeadas em frascos de cultura, a uma densidade de $0,12x10^6$ células/cm^2 e crescidas em meio Weymouth contendo 20% de soro fetal de bovino.

A 60-80% de confluência, as culturas de queratinócitos destinadas para transferência de genes foram transfectadas com um vírus de leucemia de murídeo isento de auxílio anfotrópico (ψ-CRIP), contendo o gene de β-galactosidase (lacZ). As culturas de células subconfluentes foram incubadas em três dias consecutivos com o meio contendo retrovírus. Os queratinócitos não modificados foram crescidos até à confluência, sem manipulação.

Produziu-se um total de 170 feridas de espessura total nas costas de 13 porcos, deixando intacto o músculo *panniculus carnosus*. Após hemostase cuidadosa, aplicou-se a cada ferida uma câmara de vinilo estanque a líquidos, como dispositivo de cultura de células *in vivo*. A câmara (P.A. Medical Corp., Columbia, TN) consiste de um topo de vinilo transparente flexível, ligado a uma base adesiva. A base tem uma abertura central compatível com a margem da ferida produzida. Encheram-se as câmaras com 1,2 ml de solução salina normal contendo 100 μg de estreptomicina e 100 IU penicilina/ml (n-67), queratinócitos de pele transduzidos (lacZ, n=22 hGH, n=10) ou queratinócitos não transfectados (controlos, n=71).

Começando no dia 2 (para dar tempo às células de se ligarem à superfície), as câmaras de solução salina foram trocadas e cheias diariamente.

Os efeitos do transplante de queratinócitos na re-epitelização foram estudados macroscopicamente, histologicamente e por medição das proteínas endógenas no fluido da câmara (como um parâmetro da função de barreira epitelial, avaliável de forma não invasiva). O fluido recolhido das feridas individuais foi centrifugado a 2.000 x g durante 10 minutos e em seguida passado através de um filtro (tamanho de poro de 0,45 mm, Millipore Corp., Bedford, MA). As proteínas endógenas como marcadores não invasivos do restauro da função de barreira epitelial foram medidas por um teste turbidimétrico (STANBIO CSF, Stanbio Laboratory Inc., San Antonio, TX) como descrito anteriormente por Breuing *et al.*, J. Surg. Res. 52: 50-58 (1992).

As feridas tratadas com câmara não desenvolveram nenhuma necrose tecidular, enquanto que as feridas cobertas com os pensos usuais estavam visivelmente necróticas. Esta diferença era visível macroscopicamente. Após 4 dias, tinha-se desenvolvido um tecido fibroso nas feridas tratadas em câmara, para todos os grupos. Desde o dia 6 as feridas em que foram transplantados, quer queratinócitos não modificados, quer transduzidos com retrovírus, estavam cobertas com um epitélio fino; este desenvolvimento não foi observado nos controlos de solução salina até ao dia 12, como se mostra na Figura 13. A contracção das feridas não diferia nos três grupos.

A aparência macroscópica de feridas de espessura total de porcino foi observada aos dias 3, 6 e 9 após provocar as feridas. Na confluência, os queratinócitos foram libertados dos frascos com 0,01% de tripsina e ressuspensos em solução salina normal não tamponada (0,9%), contendo 100 U de penicilina e 100 μg de estreptomicina/ml, a uma concentração de 3×10^6 células/ml. Injectou-se um volume de 1,2 ml desta suspensão em feridas de espessura total (15 x 15 mm, 9 mm de profundidade), produzidas no dorso do porco. Verificou-se que os queratinócitos ressuspensos em solução salina eram mais que 90% viáveis, tal como confirmado por absorção de azul de tripano e nova cultura do conteúdo de seringas individuais, em frascos de cultura. Calcularam-se as médias e desvios padrão para os grupos. Analisou-se a significância estatística entre os grupos com o teste-U de Mann-Whitney, não paramétrico. Realizou-se uma análise de regressão logística do restabelecimento da neo-epiderme, avaliado histologicamente.

As feridas em que foram transplantados queratinócitos desenvolveram um epitélio inicial ao dia 6, enquanto que os controlos tratados com solução salina ainda continham um tecido que não era um tecido de re-epitelização. A taxa de contracção da ferida não foi afectada. Assim, a barreira epitelial foi estabelecida significativamente mais cedo após o transplante de suspensões de queratinócitos autólogos, do que após tratamento apenas com solução salina (média ± DP 12,66 ± 16 dias versus 14,7 ± 0,7 dias; $p<0,05$).

Esta diferença foi confirmada histologicamente por documentação da epitelização completa ao dia 12 após o transplante, mas apenas no dia 16 após tratamento com solução salina. Em feridas com queratinócitos transplantados, observou-se o seguinte padrão característico. Os queratinócitos que expressão lacZ, transduzidos com retrovírus, apareceram primeiro em cachos no fundo das feridas ao dia 4, e em seguida migraram para cima, com a matriz desenvolvida de novo, observado ao dia 6. Ao dia 8, estavam presentes em todas as camadas de epitélio. Assim, estes cachos de células foram primeiro observados ao dia 4 na superfície profunda da ferida e mais tarde na matriz em desenvolvimento. Estes cachos eram evidentes até se desenvolver um novo epitélio e desapareceram a seguir.

A coloração *in vitro* de feridas com queratinócitos positivos para lacZ, transplantados revelou células positivas para β-galactosidase dentro dos cachos de colónias no fundo da ferida, estreitamente relacionados com o tecido subcutâneo, ao dia 4. Ao dia 6, as células surgiram no centro do tecido conjuntivo em desenvolvimento. As secções em série que coraram com hematoxilina e eosina e com tricromo de Masson mostraram que estes ninhos estavam rodeados de feixes de colagénio densos. Ao dia 8, os queratinócitos que expressam lacZ estavam distribuídos em todas as camadas de células do epitélio regenerado de novo, incluindo o *stratum germinativum*. As biópsias de feridas, realizadas aos 27 dias revelaram a expressão de lacZ apenas na porção superior do *stratum granulosum* e não no *stratum basale* ou no *stratum spinosum*. Recolheram-se amostras de biópsias transversais das feridas, incluindo as margens de pele não ferida, desde o dia 4 ao dia 27. Metade foi fixada em formalina a 10%, embebida em parafina e corada com hematoxilina/eosina, ou tricromo. A outra metade foi instantaneamente congelada em azoto líquido, seccionada e corada para detecção de actividade de β-galactosidade *in situ*, com o substrato 5-bromo-4-cloro-3-inolil-β-D-galatósido (cromogéneo X-Gal), que forma um precipitado azul nas células transduzidas. Ao dia 27, não foram detectados ninhos adicionais de queratinócitos no tecido sub-epidérmico.

A aparência histológica do epitélio após transplante, quer dos queratinócitos transduzidos, quer não modificados era semelhante e característica de um epitélio em multicamada cornificado. As secções horizontais ao longo da epiderme mostraram evidências de uma distribuição uniforme de células transduzidas ($280/mm^2$). Os queratinócitos transfectados, quer com lacZ, quer com hGH (n=34 feridas) transplantados em feridas, produziram hGH de forma temporária, com um pico de concentração ao dia 6, e decrescendo para 0 até ao dia 10, como se mostra na Figura 14b.

Esta experiência demonstra que as suspensões de queratinócitos podem ser transduzidas de forma estável com um gene e que estas células continuam a expressar o gene após o transplante em feridas de pele de espessura total, em porcos. Num sistema de câmara cutânea, as células foram transplantadas com sucesso, sobreviveram e evoluíram da formação de cachos para a reconstituição de um epitélio novo, de uma forma previsível. A epiderme estratificou e formou uma barreira epitelial, funcionalmente intacta. O ambiente húmido deste sistema de câmara fechada cria um ambiente favorável para o transplante de células. Inclui todos os componentes necessários, como electrólitos do soro em osmolaridade e pH fisiológicos e uma variedade de factores de crescimento (*e.g.* factor de crescimento de fibroblastos básico, factor de crescimento epidérmico) que exibem actividade mitogénica para os queratinócitos.

A expressão decrescente de lacZ pode ser explicada por uma diferenciação terminal inicial e rápida dos queratinócitos transduzidos, que é provável quando se tem em conta o padrão específico da expressão de lacZ. A concentração elevada de cálcio no fluido, bem como a presença de outros mediadores e as interacções destes mediadores com células na ferida, pode induzir a diferenciação terminal de queratinócitos. A formação morfológica e funcional *in vivo* de uma barreira epitelial de queratinócitos que expressam lacZ indica que as células sofreram estratificação e diferenciação terminal. Esta conclusão é suportada pela verificação de queratinócitos que expressam lacZ apenas nas camadas estratificadas mais superiores do epitélio, após 27 dias. Como tal, esta experiência mostra que as suspensões de queratinócitos transduzidos com retrovírus forma um epitélio em multicamada *in vivo* após o transplante autólogo em feridas de espessura total. Além disso, estas células proporcionam uma função, de modo semelhante aos queratinócitos não modificados, na medida em que estratificam e formam uma barreira epitelial à água e perda de proteína. Assim, é possível regenerar um novo epitélio com propriedades fisiológicas, através da utilização de queratinócitos geneticamente manipulados.

Exemplo 3: Introdução de ADN em queratinócitos e fibroblastos, utilizando "tatuagem"

Misturaram-se partículas de óxido de ferro com tamanhos desde 0,05 mícron a 1 mícron de diâmetro com plasmídeos de ADN em tampão Tris-EDTA. Colocaram-se gotas deste material em pele humana intacta. Colocou-se um dispositivo de tatuagem contendo microagulhas no material na pele, para inserir, ou injectar, o ADN nos queratinócitos

superficiais, como se mostra na Figura 6, bem como nos queratinócitos hemocitoblastos na epiderme profunda, como se mostra na Figura 7, ou fibroblastos dérmicos, como se mostra na Figura 8.

Lisboa, 13. NOV. 2000

Por APPLIED TISSUE TECHNOLOGIES LLC
- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de material genético exógeno para a produção de um medicamento para utilização num método de manipulação genética de células *in vivo* num paciente, por introdução de material genético exógeno nas células a ser manipuladas, em que se liga uma câmara formada por um material impermeável a gases e humidade, flexível, num local de um paciente, em que as células deverão ser manipuladas e que contém um meio fluido adequado para a cultura de células.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que as células são queratinócitos.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o material genético está na forma de um vector viral ou plasmídeo.

4. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que as células são manipuladas para expressar material genético exógeno.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que as células são manipuladas para expressar proteínas seleccionadas a partir de hormonas, imunomoduladores, factores de coagulação e factores de crescimento.

6. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que as células são manipuladas para não expressar proteínas que desencadeiem uma reacção imunitária contra as células.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 6, em que as células não expressam antigénios HLA.

8. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que as condições de cultura dentro da câmara são controladas até as células terem sarado até à confluência.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 8, em que a temperatura, pH, crescimento de microorganismos, concentração de gases e iões dentro da câmara são controlados até as células terem sarado até à confluência.

10. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o material genético é utilizado em combinação com um ou mais compostos seleccionados a

partir de antibióticos, anestésicos, agentes quimioterapêuticos, imunomoduladores e factores de crescimento.

11. Utilização na produção de um medicamento de material genético exógeno em combinação com uma câmara para a cultura de células *in vivo,* num local num paciente, em que a câmara é formada por um material impermeável a gases e humidade, flexível, e compreende uma abertura que pode fixar-se na periferia da pele do paciente, em que a combinação é utilizada na produção de um medicamento para utilização num método para manipular geneticamente as células *in vivo*, num paciente, por introdução do material genético exógeno nas células a ser manipuladas, em que a câmara é ligada a um local num paciente onde as células deverão ser manipuladas e em que a câmara contém um meio fluido adequado para a cultura de células e é aberta para as células a ser manipuladas.

Lisboa, 13 NOV 2000

Por APPLIED TISSUE TECHNOLOGIES LLC
- O AGENTE OFICIAL -
O ADJUNTO

ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

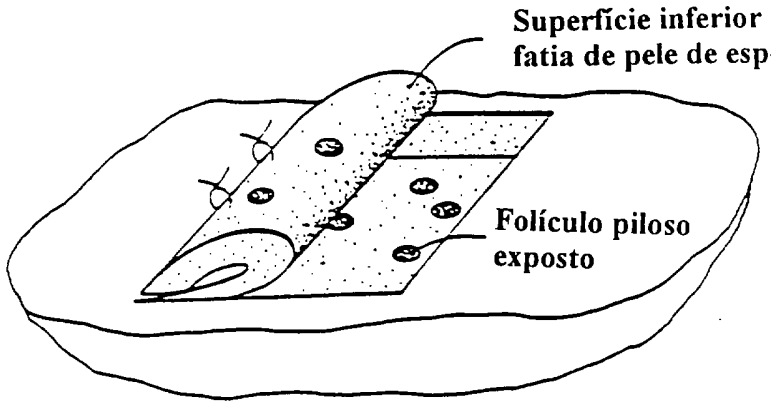


FIG. 1

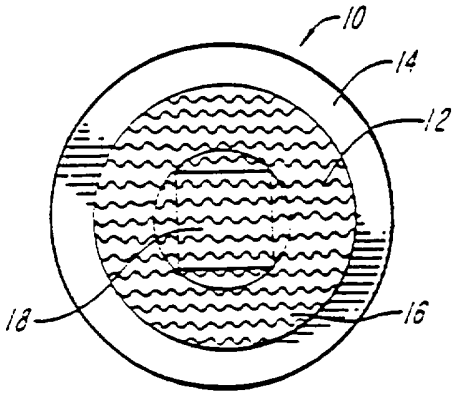


FIG. 2A

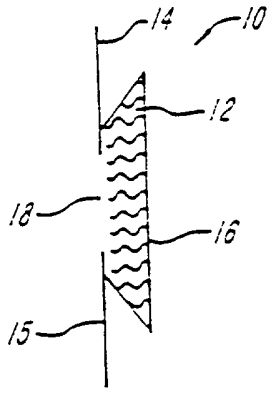


FIG. 2B

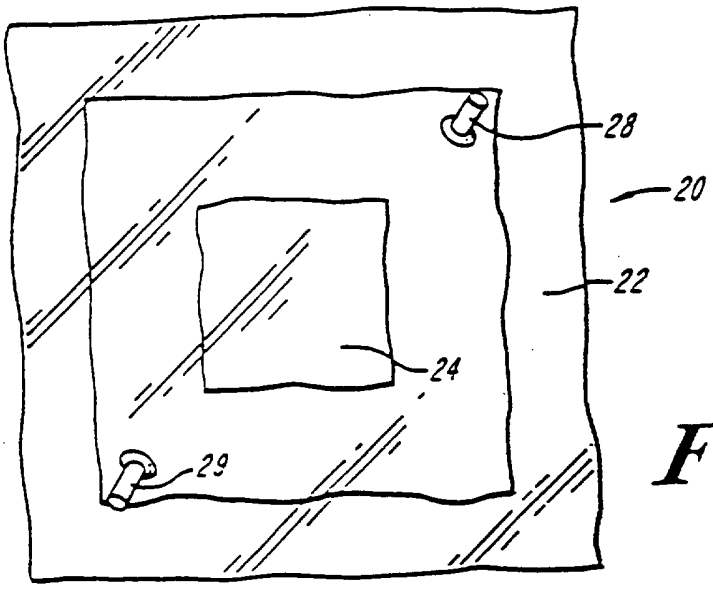


FIG. 3

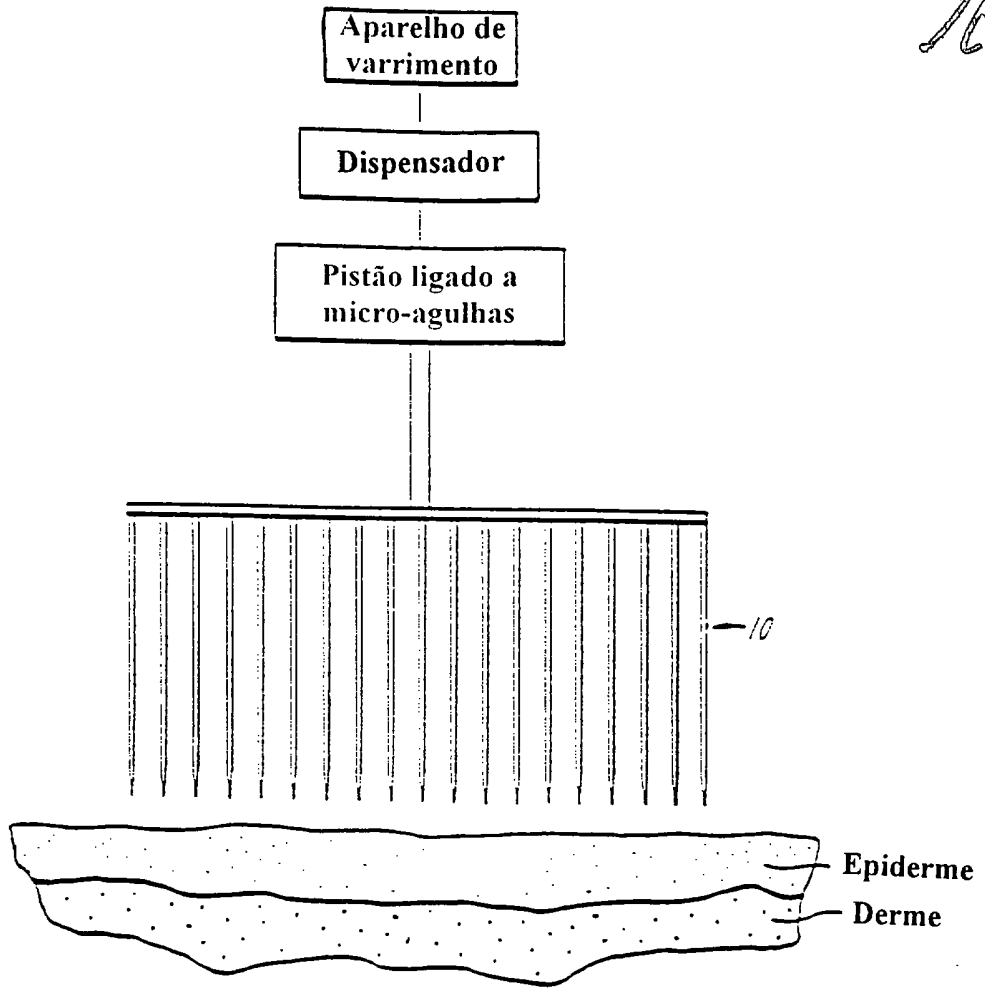


FIG. 4

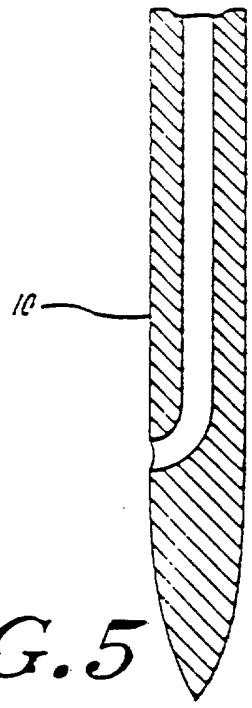


FIG. 5

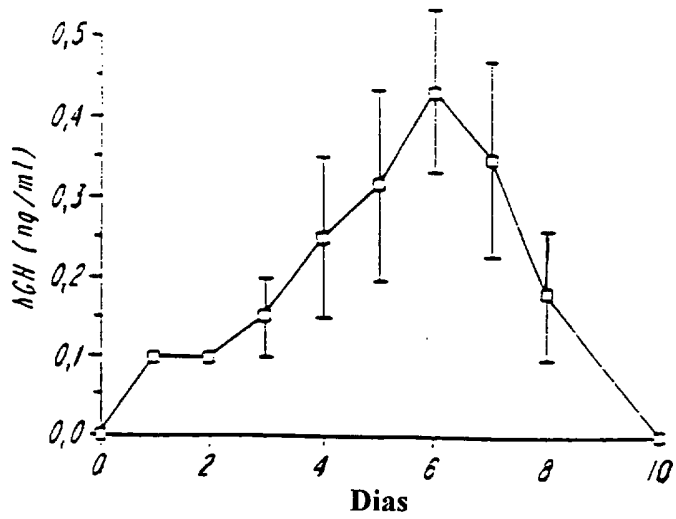


FIG. 11

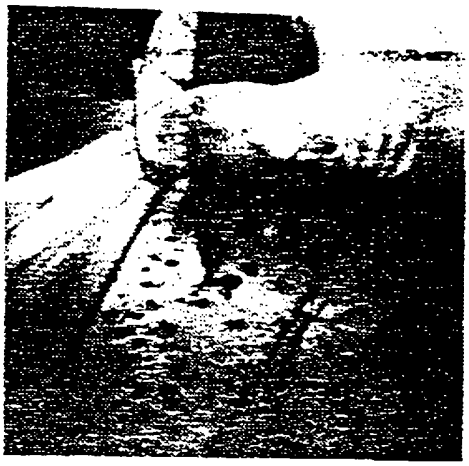


FIG. 6



FIG. 7



FIG. 8

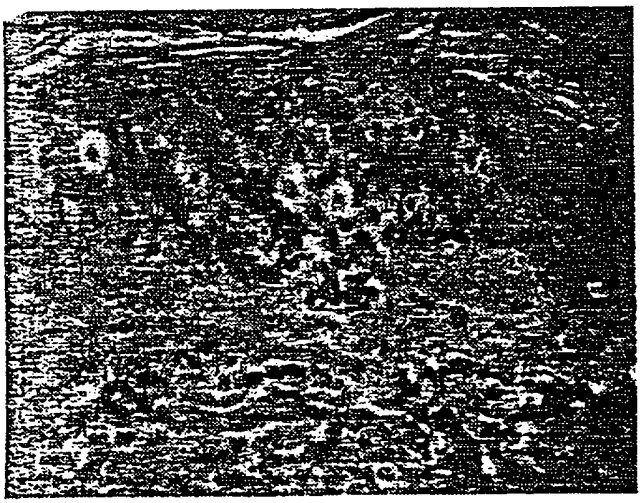


FIG. 9

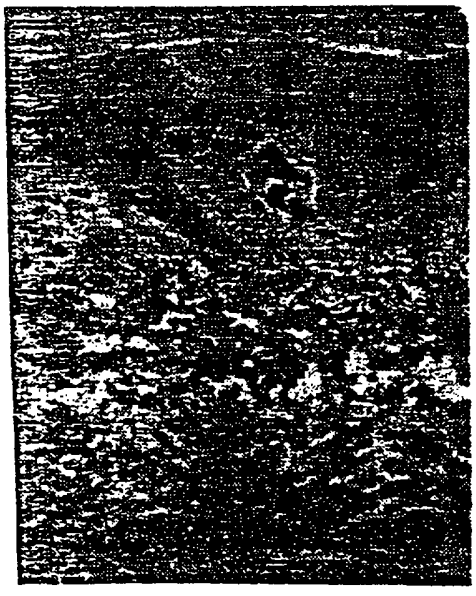


FIG. 10

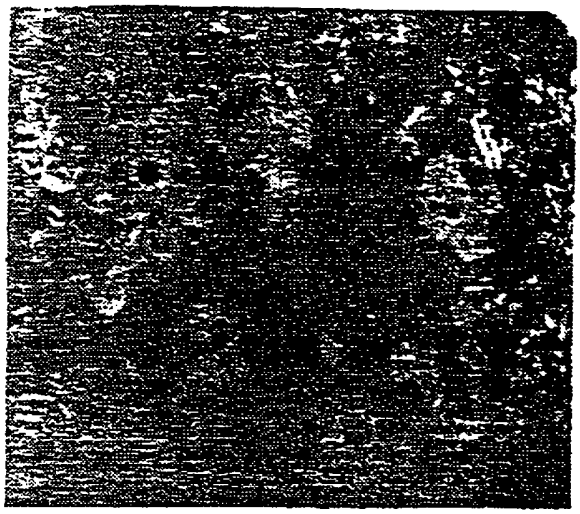


FIG. 12A

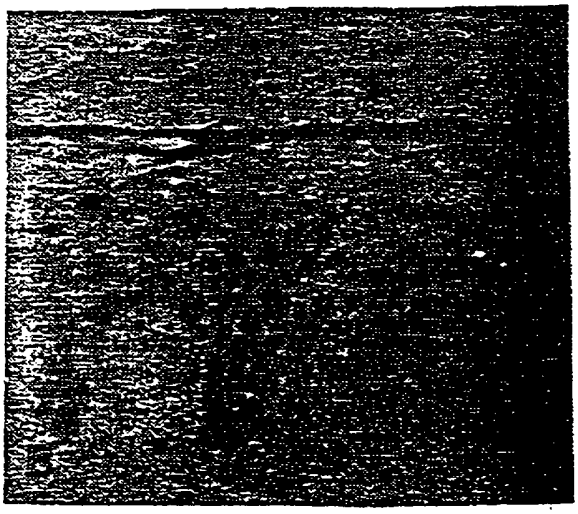


FIG. 12B

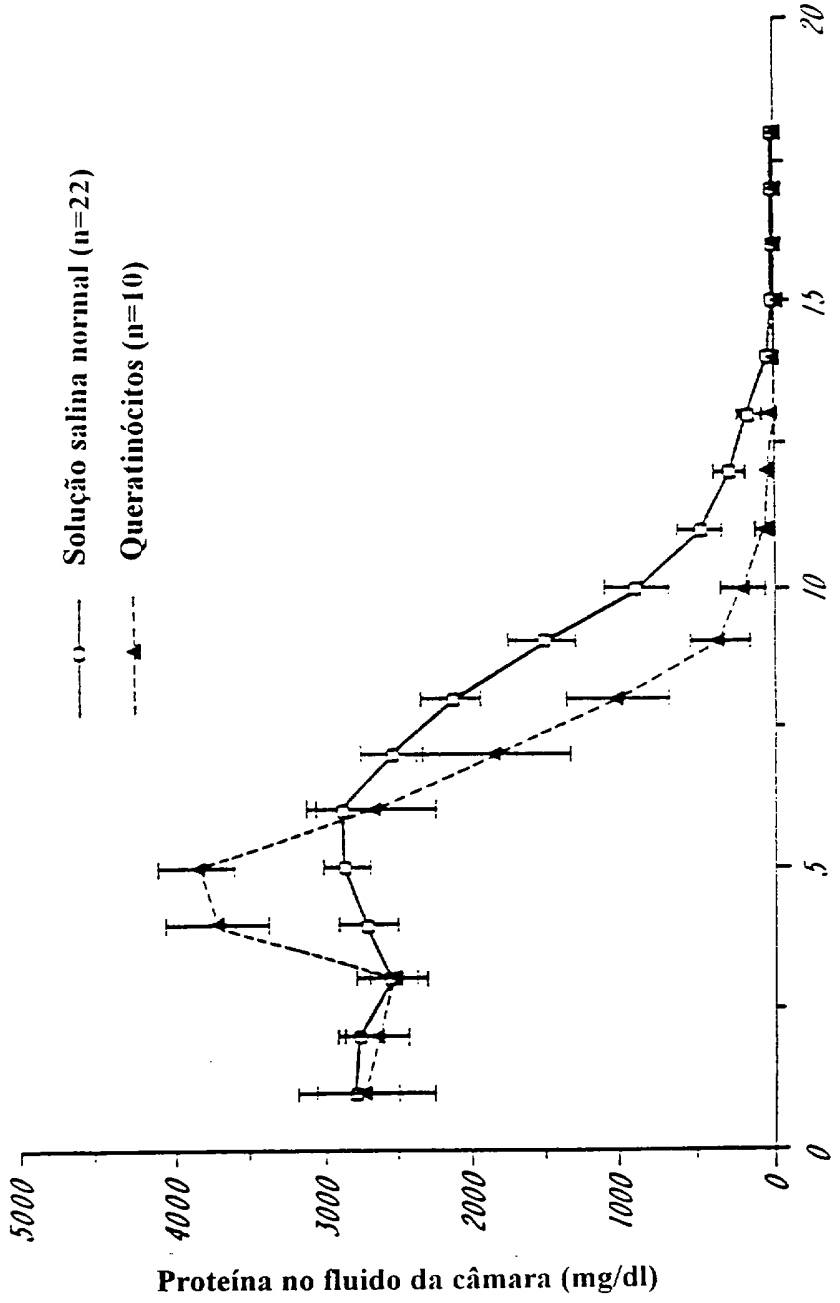

Solução salina normal (n=22)
Queratinócitos (n=10)
Proteína no fluido da câmara (mg/dl)
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
Dia

FIG. 13

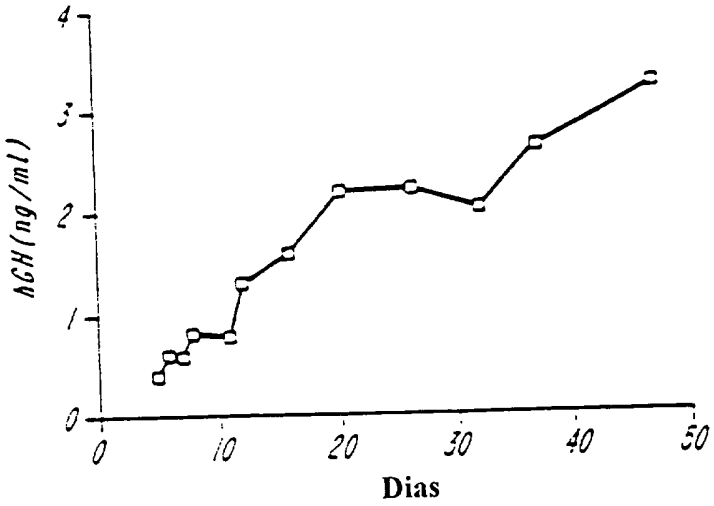


FIG. 14A

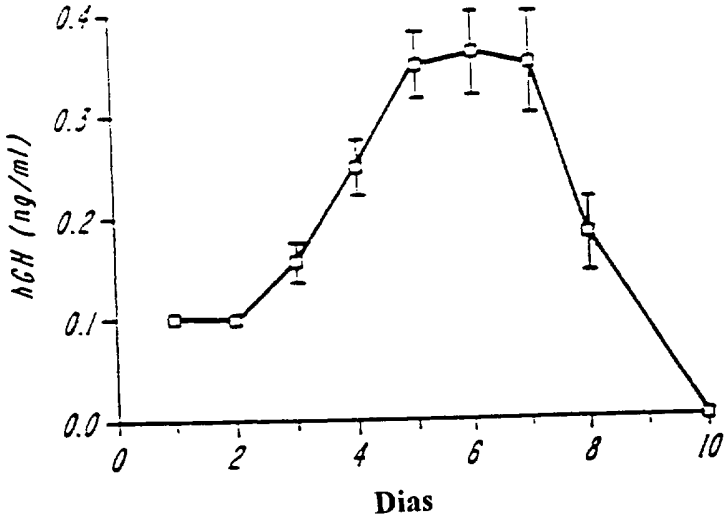


FIG. 14B