

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2002.03.01	(73) Titular(es): STRATATECH CORPORATION 505 SOUTH ROSA ROAD MADISON, WI 53719 US
(30) Prioridade(s): 2001.03.02 US 273034 P 2001.05.01 US 287898 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2004.04.07	(72) Inventor(es): ALLEN COMER US LYNN ALLEN-HOFFMANN US MICHAEL HOFFMANN US CATHY ANN-RASMUSSEN IVARIE US PAUL BARTH CONRAD US
(45) Data e BPI da concessão: 2013.12.11 056/2014	(74) Mandatário: ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **SUBSTITUTOS DE PELE MELHORADOS E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A SUBSTITUTOS DE PELE CULTIVADOS IN VITRO E, EM PARTICULAR, A SUBSTITUTOS DE PELE CULTIVADOS IN VITRO QUE TÊM FUNÇÃO DE BARREIRA MELHORADA. EM ALGUMAS FORMAS DE REALIZAÇÃO, A FUNÇÃO DE BARREIRA MELHORADA É UM RESULTADO DE CONDIÇÕES DE CULTURA MELHORADAS, ENQUANTO NOUTRAS FORMAS DE REALIZAÇÃO, A FUNÇÃO DE BARREIRA MELHORADA RESULTA DE MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE QUERATINÓCITOS. AS CONDIÇÕES DE CULTURA MELHORADAS PARA MELHORAR A FUNÇÃO DE BARREIRA INCLUEM CULTURA ORGANOTÍPICA NA PRESENÇA DE ÁCIDO LINOLEICO E/OU ÁCIDO LINOLEICO A CERCA DE 75% DE HUMIDADE. AS MODIFICAÇÕES GENÉTICAS ADEQUADAS PARA MELHORAMENTO DA FUNÇÃO DE BARREIRA INCLUEM TRANSFECCÃO COM UMA CONSTRUÇÃO DE ADN CAPAZ DE EXPRESSÃO DE GKLF. A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA AINDA MÉTODOS MELHORADOS DE UTILIZAÇÃO DESSES SUBSTITUTOS DE PELE NO RASTREIO DE COMPOSTOS PARA ACTIVIDADE DE IRRITAÇÃO, ASSIM COMO PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS GENES RESPONSIVOS E IRRITANTES.

RESUMO

"SUBSTITUTOS DE PELE MELHORADOS E SUAS UTILIZAÇÕES"

A presente invenção refere-se a substitutos de pele cultivados *in vitro* e, em particular, a substitutos de pele cultivados *in vitro* que têm função de barreira melhorada. Em algumas formas de realização, a função de barreira melhorada é um resultado de condições de cultura melhoradas, enquanto noutras formas de realização, a função de barreira melhorada resulta de modificação genética de queratinócitos. As condições de cultura melhoradas para melhorar a função de barreira incluem cultura organotípica na presença de ácido linoleico e/ou ácido linoleico a cerca de 75% de humidade. As modificações genéticas adequadas para melhoramento da função de barreira incluem transfecção com uma construção de ADN capaz de expressão de GKLF. A presente invenção proporciona ainda métodos melhorados de utilização desses substitutos de pele no rastreio de compostos para actividade de irritação, assim como para identificação de novos genes responsivos e irritantes.

DESCRIÇÃO

"SUBSTITUTOS DE PELE MELHORADOS E SUAS UTILIZAÇÕES"

Este pedido reivindica prioridade para os pedidos de patente provisórios U.S. com os números de série 60/287898, apresentado a 5/01/2001 e 60/273034, apresentado a 3/02/2001 e pedidos de Patente U.S. com o N° de Série Ainda Não Atribuído, apresentado a 3/1/02 com o Rótulo de Correio Expresso XXX, N° de Série Ainda Não Atribuído, apresentado a 3/1/02 com o Rótulo de Correio Expresso XXX e N° de Série Ainda Não Atribuído, apresentado a 3/1/02 com o Rótulo de Correio Expresso XXX. Este pedido de patente foi suportado, em parte, pelas bolsas NIH SBIR 1 R43 AR47499-01 e 1 R43 ES10692-01A1.

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a substitutos de pele cultivados *in vitro* e, em particular, a substitutos de pele cultivados *in vitro* que têm função de barreira melhorada, como definido nas reivindicações. Em algumas formas de realização, a função de barreira melhorada é um resultado de condições de cultura melhoradas, enquanto noutras formas de realização, a função de barreira melhorada resulta de modificação genética de queratinócitos. A presente invenção refere-se, ainda, à utilização desses substitutos de pele para testes de irritação.

Antecedentes da Invenção

Existe um grande mercado para os produtos e serviços de teste que conseguem prever os efeitos da função de barreira da pele. Existe uma necessidade particular para ensaios validados que permitissem que as empresas com compostos de fase inicial testassem a função de barreira sem recorrerem a testes epicutâneos animais e humanos dispendiosos. As empresas de cosméticos despendem, aproximadamente, 50 milhões a 100 milhões de dólares por ano com este tipo de testes. As empresas de produtos domésticos e farmacêuticos têm gastos semelhantes.

Além disso, existe um mercado substancial para produtos para terapia de queimaduras e para a reparação ou suporte de tecidos epiteliais apropriados e outras utilizações de oclusão de feridas e pele. Por exemplo, as úlceras venosas da perna afectam cerca de 1 milhão de pessoas nos Estados Unidos e 3 milhões a nível mundial e outros estados ulcerosos, tais como úlceras diabéticas e úlceras de pressão (escaras), afectam, aproximadamente, 10 milhões de pessoas a nível mundial. Os cuidados correntes das úlceras venosas podem levar mais de 6 meses a curar uma ferida e custam mais de 1000000 de dólares. Além disso, as úlceras dos pés são uma causa de destaque da hospitalização de entre os diabéticos e estima-se que custem ao sistema de saúde dos EUA mais de mil milhões de dólares anualmente. Estimativas para hospitalizações para queimaduras nos Estados Unidos variam entre 60000 e 8000 anualmente e os custos para recuperação de lesões agudas variam entre 36000 e 117000 dólares por doente.

Uma função fundamental da pele humana é proporcionar uma barreira à perda de água transcutânea e uma barreira para

prevenir a entrada de compostos tóxicos ou microrganismos. O desenvolvimento da barreira de permeabilidade epidérmica requer a síntese e metabolismo coordenados de proteína específica de queratinócitos e produtos lipídicos que são agrupados na camada de pele mais externa, o estrato córneo. A expressão de muitas das enzimas chave requeridas para a síntese destes lípidos extracelulares é regulada positivamente durante a diferenciação de queratinócitos ou após disrupção da função de barreira epidérmica, sugerindo a existência de factores de transcrição que funcionam para promover o desenvolvimento da função de barreira (Sando *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(36): 22044-51 (1996); Watanabe *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273(16): 9651-5 (1998)). A função de barreira é comprometida por exposição a substâncias irritantes, por infecção e por um número de doenças, incluindo dermatite atópica e psoríase. Os stresses ambientais podem exacerbar os efeitos destes estados na função de barreira essencial da pele. Muitas indústrias estão interessadas em que efeito o seu produto tem na função de barreira da pele. Por exemplo, as empresas que distribuem fármacos transdermicamente necessitam de facilitar a penetração do agente activo para além da barreira. As empresas de cosméticos estão interessadas em descobrirem formulações que melhorem a função de barreira.

De modo a testar compostos ou formulações antecipadamente no processo de desenvolvimento com velocidade e exactidão, seria benéfico ter um sistema de teste *in vitro* que mimetizasse as propriedades de barreira da pele humana. Contudo, estudos publicados indicam que as culturas de equivalentes de pele existentes, tais como EPIDERM, SKINETHICS ou EPISKIN, têm função de barreira muito fraca (Ponec *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 109(3): 348-55 (1997)). Contudo, tem havido progresso recente substancial na compreensão da importância da vitamina C,

receptores hormonais nucleares, síntese lipídica e humidade no correcto desenvolvimento da função de barreira (Poniec *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 109(3): 348-55 (1997); Denda *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 111(5): 858-63 (1998); Hanley *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 100(3): p. 705-12 (1997); Hanley *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 113(5): 788-95 (1999)). Em muitos casos, estes estudos focam-se em sinais químicos ou ambientais que desencadeiam o programa de desenvolvimento natural que estabelece a função de barreira num momento específico *in utero*. Claramente, existe uma grande necessidade para substitutos de pele tendo função de barreira melhorada.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a composições como definidas nas reivindicações.

A presente invenção proporciona composições compreendendo um equivalente de pele humana, o equivalente de pele tendo uma capacitância eléctrica de superfície de 40 a 240 pF. Em algumas formas de realização preferidas, o equivalente de pele tem uma capacitância eléctrica de superfície de cerca de 80 a cerca de 120 pF. O teor combinado de ceramidas 5, 6, e 7 no equivalente de pele é de 20 a 50% do teor de ceramida total. Em outras formas de realização preferidas, o teor de ceramida 2 no equivalente de pele é de 10 a 40% do teor de ceramida total. O presente pedido proporciona formas de realização adicionais que não fazem parte da invenção

Em algumas formas de realização, o presente pedido proporciona queratinócitos isolados compreendendo uma sequência

codificando GKLF ligado de modo operativo a um promotor exógeno. Ainda em formas de realização adicionais, o presente pedido proporciona uma cultura organotípica de queratinócitos compreendendo uma sequência codificando exógeno GKLF ligado de modo operativo a um promotor exógeno.

Em algumas formas de realização, o presente pedido proporciona métodos para preparação de equivalentes de pele tendo função de barreira melhorada. Em algumas formas de realização, os métodos compreendem proporcionar queratinócitos e meios de cultura compreendendo ácido ascórbico e ácido linoleico; e o cultivo dos queratinócitos sob condições de modo a que um equivalente de pele tendo função de barreira melhorada seja formado. Em algumas formas de realização, as condições de cultura incluem o cultivo a cerca de 50 a 95% de humidade, de um modo preferido, cerca de 75% de humidade. Em algumas formas de realização preferidas, o ácido ascórbico é proporcionado à concentração de cerca de 10 a 100 microgramas/mL. Ainda em formas de realização preferidas adicionais, o ácido linoleico é proporcionado a uma concentração desde cerca de 5 a 80 micromolar. O presente pedido não está limitado a equivalentes de pele formados a partir de uma fonte particular de queratinócitos. De facto, os equivalentes de pele podem ser formados a partir de uma variedade de queratinócitos primários e imortais, incluindo mas não limitados a células NIKS. Ainda em formas de realização adicionais, os queratinócitos expressam GKLF de tipo selvagem ou variante exógeno. Ainda em formas de realização adicionais, os queratinócitos são derivados de duas fontes diferentes. Noutras formas de realização, o equivalente de pele tem uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 40 a cerca de 240 pF. Em algumas formas de realização preferidas, o equivalente de pele tem uma capacitância eléctrica

de superfície de cerca de 80 a cerca de 120 pF. Em outras formas de realização preferidas, o teor de ceramidas 5, 6, e 7 no equivalente de pele é de cerca de 20 a cerca de 50% do teor de ceramida total. Ainda em outras formas de realização preferidas, o teor de ceramida 2 no equivalente de pele é de cerca de 10 a cerca de 40% do teor de ceramida total. Ainda em formas de realização adicionais, a presente invenção proporciona o equivalente de pele preparado pelo método acabado de descrever.

Noutras formas de realização, o presente pedido proporciona métodos de preparação de equivalentes de pele tendo função de barreira melhorada compreendendo: proporcionar queratinócitos e uma construção de ADN compreendendo uma sequência codificando GKLF ligado de modo operativo a um promotor exógeno; transfectar os queratinócitos com a referida construção de ADN para proporcionar queratinócitos transfectados; e cultivar os queratinócitos transfectados sob condições de modo a que um equivalente de pele tendo função de barreira melhorada seja formado. Em algumas formas de realização, a etapa de cultivo compreende cultivar os queratinócitos transfectados em meios de cultura compreendendo ácido ascórbico e ácido linoleico. Em algumas formas de realização preferidas, o ácido ascórbico é proporcionado à concentração de cerca de 10 a 100 microgramas/mL. Ainda em formas de realização preferidas adicionais, o ácido linoleico é proporcionado a uma concentração de cerca de 5 a 80 micromolar. O presente pedido não está limitado a equivalentes de pele formados a partir de uma fonte particular de queratinócitos. De facto, os equivalentes de pele podem ser formados a partir de uma variedade de queratinócitos primários e imortais, incluindo mas não limitados a células NIKS. Ainda em formas de realização adicionais, os queratinócitos expressam GKLF de tipo selvagem ou variante.

Ainda em formas de realização adicionais, os queratinócitos são derivados de duas fontes diferentes. Noutras formas de realização, o equivalente de pele tem uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 40 a cerca de 240 pF. Em algumas formas de realização preferidas, o equivalente de pele tem uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 80 a cerca de 120 pF. Em outras formas de realização preferidas, o teor de ceramidas 5, 6 e 7 no equivalente de pele é de cerca de 20 a cerca de 50% do teor de ceramida total. Ainda em outras formas de realização preferidas, o teor de ceramida 2 no equivalente de pele é de cerca de 10 a cerca de 40% do teor de ceramida total. Ainda em formas de realização adicionais, o presente pedido proporciona o equivalente de pele preparado pelos métodos descritos.

Ainda em outras formas de realização, o presente pedido proporciona métodos para o rastreio de compostos. Em algumas formas de realização, os métodos compreendem proporcionar um equivalente de pele tendo uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 40 a cerca de 240 pF; e tratar o equivalente de pele com o referido composto. Em formas de realização adicionais, o método compreende a etapa c) de ensaio do efeito do referido composto no referido equivalente de pele. Em algumas formas de realização preferidas, o composto é seleccionado de uma biblioteca combinatória. O presente pedido não está limitado a equivalentes de pele formados a partir de uma fonte particular de queratinócitos. De facto, os equivalentes de pele podem ser formados a partir de uma variedade de queratinócitos primários e imortais, incluindo mas não limitados a células NIKS. Ainda em formas de realização adicionais, os queratinócitos expressam GKLF de tipo selvagem ou variante exógeno. Ainda em formas de realização adicionais, os

queratinócitos são derivados de duas fontes diferentes. Noutras formas de realização, o equivalente de pele tem uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 40 a cerca de 240 pF. Em algumas formas de realização preferidas, o equivalente de pele tem uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 80 a cerca de 120 pF. Em outras formas de realização preferidas, o teor de ceramidas 5, 6, e 7 no equivalente de pele é de cerca de 20 a cerca de 50% do teor de ceramida total. Ainda em outras formas de realização preferidas, o teor de ceramida 2 no equivalente de pele é de cerca de 10 a cerca de 40% do teor de ceramida total.

Noutras formas de realização, o presente pedido proporciona kits compreendendo, pelo menos, um equivalente de pele tendo uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 40 a cerca de 240 pF. Ainda noutras formas de realização, o kit inclui meios de cultura para cultivo de, pelo menos, um equivalente de pele. Em algumas formas de realização, o kit compreende, ainda, instruções para cultivo do equivalente de pele. Noutras formas de realização, o kit compreende, ainda, instruções para testagem de compostos utilizando o referido, pelo menos um, equivalente de pele. A presente invenção não está limitada a equivalentes de pele formados a partir de uma fonte particular de queratinócitos. De facto, os equivalentes de pele podem ser formados a partir de uma variedade de queratinócitos primários e imortais, compreendendo, pelo menos, células NIKS. Ainda em formas de realização adicionais, os queratinócitos expressam GKLf de tipo selvagem ou variante. Ainda em formas de realização adicionais, os queratinócitos são derivados de duas fontes diferentes. Noutras formas de realização, o equivalente de pele tem uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 80 a cerca de 120 pF. Em algumas formas de realização preferidas, o

equivalente de pele tem uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 80 a cerca de 120 pF. Em outras formas de realização preferidas, o teor de ceramidas 5, 6, e 7 no equivalente de pele é de cerca de 20 a cerca de 50% do teor de ceramida total. Ainda em outras formas de realização preferidas, o teor de ceramida 2 no equivalente de pele é de cerca de 10 a cerca de 40% do teor de ceramida total.

Ainda em formas de realização adicionais, o presente pedido proporciona um método de rastreio de compostos suspeitos de serem irritantes de pele, compreendendo: proporcionar um composto suspeito ser um irritante de pele; um equivalente de pele compreendendo uma construção de gene repórter responsivo e irritante; e a colocação do referido equivalente de pele em contacto com o referido composto; e a medição do nível de expressão génica da referida construção de gene repórter. Em algumas formas de realização, o equivalente de pele tem uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 80 a cerca de 120 pF. Em algumas formas de realização preferidas, o teor de ceramidas 5, 6 e 7 no equivalente de pele é de cerca de 20 a cerca de 50% do teor de ceramida total. Noutras formas de realização, o teor de ceramida 2 no referido equivalente de pele é de cerca de 10 a cerca de 40% do teor de ceramida total. Em algumas formas de realização, o equivalente de pele compreende queratinócitos seleccionados do grupo consistindo em queratinócitos primários e queratinócitos imortalizados. Em algumas formas de realização, os queratinócitos imortalizados são células NIKS. Noutras formas de realização, os queratinócitos expressam GKLF heterólogo. Ainda noutras formas de realização, a construção de repórter responsivo e irritante compreende, pelo menos, uma porção de um gene seleccionado do grupo consistindo em interleucina 8 e interleucina 1 α . Em

algumas formas de realização preferidas, a porção compreende uma região regulatória.

O presente pedido também proporciona uma composição compreendendo células NIKS compreendendo uma construção de gene repórter responsivo e irritante. Em algumas formas de realização, as células NIKS têm uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 40 a cerca de 240 pF. Noutras formas de realização, as células NIKS têm uma capacitância eléctrica de superfície desde cerca de 80 a cerca de 120 pF. Em algumas formas de realização, o teor combinado de ceramidas 5, 6, e 7 nas células NIKS é de cerca de 20 a cerca de 50% do teor de ceramida total. Noutras formas de realização, o teor de ceramida 2 nas referidas células NIKS é de cerca de 10 a cerca de 40% do teor de ceramida total. Ainda em formas de realização adicionais, as células NIKS expressam GKLF heterólogo. Em algumas formas de realização, as células NIKS compreende, ainda, uma construção de ADN compreendendo uma sequência codificando GKLF ligado de modo operativo a um promotor exógeno. Ainda noutras formas de realização, as células NIKS compreendem, ainda, queratinócitos derivados de duas fontes diferentes. Noutras formas de realização, as células NIKS estão presentes como uma aplicação de cultura organotípica.

Ainda noutras formas de realização, o presente pedido proporciona um método de identificação de genes responsivos e irritantes, compreendendo: proporcionar um composto irritante de pele; uma matriz de expressão génica; e um equivalente de pele; e a colocação do referido composto irritante de pele em contacto com o referido equivalente de pele para gerar equivalente de pele tratado irritante; isolamento de uma primeira amostra de ARNm do referido equivalente de pele tratado irritante e uma

segunda amostra de ARNm do referido equivalente de pele; colocação das referidas primeira e segunda amostras de ARNm em contacto com a referida matriz de expressão génica; análise da referida matriz de expressão génica sob condições de modo a que seja determinada a identidade dos genes que são expressos em níveis maiores no referido equivalente de pele tratado irritante do que no referido equivalente de pele. Em algumas formas de realização, o equivalente de pele compreende queratinócitos humanos cultivados. Noutras formas de realização, os queratinócitos humanos cultivados estão presentes como uma cultura organotípica. Em algumas formas de realização, a construção de repórter responsivo e irritante compreende, pelo menos, uma porção de um gene seleccionado do grupo consistindo em interleucina 8 e interleucina 1 α . Em algumas formas de realização preferidas, a porção compreende uma região regulatória. Em algumas formas de realização, a matriz génica compreende sequências de ADNc humano.

O presente pedido também proporciona substitutos de pele cultivados *in vitro* e, em particular, métodos melhorados para cultura organotípica de substitutos de pele. Em algumas formas de realização, o presente pedido proporciona processos para preparação de um equivalente dérmico semeado, compreendendo: proporcionar um equivalente dérmico, queratinócitos e meios de cultura tendo uma interface de ar; cultivar o equivalente dérmico nos meios de cultura; levantar o equivalente dérmico à interface de ar para proporcionar um equivalente dérmico levantado; e semear o equivalente dérmico com os queratinócitos para proporcionar um equivalente dérmico semeado. A utilização de queratinócitos desde uma variedade de fontes está contemplada, incluindo mas não limitada a queratinócitos seleccionados do grupo consistindo em queratinócitos humanos

primários e queratinócitos humanos imortalizados. Em algumas formas de realização particularmente preferidas, os queratinócitos imortalizados são células NIKS. Em algumas formas de realização preferidas, o equivalente dérmico compreende colagénio e fibroblastos. A utilização de uma variedade de tipos de colagénio está contemplada, incluindo mas não limitada a colagénio de tendão de cauda de rato. Do mesmo modo, a utilização de uma variedade de fibroblastos está contemplada, incluindo mas não limitada a células NHDF. Em algumas formas de realização particularmente preferidas, a etapa de levantamento compreende, ainda, a incubação do equivalente dérmico levantado na interface de ar durante, pelo menos, seis horas antes da sementeira. Em outras formas de realização particularmente preferidas, a etapa de levantamento compreende, ainda, a incubação do equivalente dérmico levantado na interface de ar durante, pelo menos, doze horas antes da sementeira. Ainda em outras formas de realização particularmente preferidas, a etapa de levantamento compreende, ainda, a incubação do equivalente dérmico levantado na interface de ar durante, pelo menos, dezoito horas antes da sementeira. Ainda em mais formas de realização preferidas, a etapa de levantamento compreende, ainda, a incubação do equivalente dérmico levantado na interface de ar durante cerca de 24 horas antes da sementeira. Ainda em outras formas de realização preferidas, a etapa de levantamento compreende, ainda, a incubação do equivalente dérmico levantado na interface de ar durante cerca de seis horas a cerca de 24 horas antes da sementeira.

Em algumas formas de realização, os métodos do presente pedido compreendem, ainda, a etapa de incubação do equivalente de pele dérmico semeado sob condições de modo a que um equivalente de pele seja formado. Em algumas formas de

realização preferidas, o equivalente de pele é estratificado. Em formas de realização particularmente preferidas, o equivalente de pele é estratificado em epitélios escamosos. Ainda em formas de realização adicionais, a presente invenção proporciona equivalentes dérmicos semeados e equivalentes de pele produzidos pelos métodos anteriores.

Ainda noutras formas de realização, o presente pedido proporciona composições compreendendo uma câmara de crescimento tendo uma superfície inferior porosa e uma parede lateral, o inferior poroso tendo nele um equivalente dérmico, em que o equivalente dérmico está substancialmente aderido à parede lateral da câmara de crescimento. O presente pedido não está limitado a câmaras de crescimento de qualquer tamanho particular. De facto, estão contempladas câmaras de crescimento de uma variedade de tamanhos. Em algumas formas de realização preferidas, o inferior poroso da câmara de crescimento tem cerca de 0,1 a 20,0 centímetros em diâmetro. Em outras formas de realização preferidas, o inferior poroso da câmara de crescimento tem cerca de 1,0 centímetros em diâmetro. Em algumas formas de realização preferidas, o equivalente dérmico compreende colagénio e fibroblastos. A utilização de uma variedade de tipos de colagénio está contemplada, incluindo mas não limitada a colagénio de tendão de cauda de rato. Do mesmo modo, a utilização de uma variedade de fibroblastos está contemplada, incluindo mas não limitada a células NHDF. Em algumas formas de realização, a composição compreende, ainda, queratinócitos; em que os queratinócitos são semeados no equivalente dérmico para formar um equivalente de pele. A utilização de queratinócitos desde uma variedade de fontes está contemplada, incluindo mas não limitada a queratinócitos seleccionados do grupo consistindo em queratinócitos humanos

primários e queratinócitos humanos imortalizados. Em algumas formas de realização particularmente preferidas, os queratinócitos imortalizados são células NIKS. Em algumas formas de realização preferidas, os queratinócitos estão estratificados. Em formas de realização particularmente preferidas, os queratinócitos estão estratificados em epitélios escamosos.

Ainda em formas de realização adicionais, o presente pedido proporciona uma composição compreendendo um equivalente dérmico, em que o equivalente dérmico contém cerca de 0,2 mg de colagénio por centímetro quadrado do equivalente dérmico a 2,0 mg de colagénio por centímetro quadrado do equivalente dérmico. Em algumas formas de realização particularmente preferidas, o equivalente dérmico contém cerca de 0,22 mg de colagénio por centímetro quadrado do equivalente dérmico a 1,0 mg de colagénio por centímetro quadrado do equivalente dérmico. Noutras formas de realização particularmente preferidas, o equivalente dérmico contém cerca de 0,5 mg de colagénio por centímetro quadrado do equivalente dérmico. Em algumas formas de realização, a composição compreende ainda queratinócitos, em que os queratinócitos são semeados no equivalente dérmico para formar um equivalente de pele. A utilização de queratinócitos desde uma variedade de fontes está contemplada, incluindo mas não limitada a queratinócitos seleccionados do grupo consistindo em queratinócitos humanos primários e queratinócitos humanos imortalizados. Em algumas formas de realização particularmente preferidas, os queratinócitos imortalizados são células NIKS. Em algumas formas de realização preferidas, os queratinócitos são estratificados. Em formas de realização particularmente preferidas, os queratinócitos estão estratificados em epitélios escamosos. Em algumas formas de realização preferidas, o

equivalente dérmico compreende colagénio e fibroblastos. A utilização de uma variedade de tipos de colagénio está contemplada, incluindo mas não limitada a colagénio de tendão de cauda de rato. Do mesmo modo, a utilização de uma variedade de fibroblastos está contemplada, incluindo mas não limitada a células NHDF.

Ainda em formas de realização adicionais, o presente pedido proporciona uma composição compreendendo BSA, isoproterenol, carnitina, serina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, α -tocoferol, ácido ascórbico e EGF. As quantidades destes compostos na composição podem variar. Em formas de realização preferidas, a BSA, isoproterenol, carnitina, serina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, α -tocoferol, ácido ascórbico e EGF estão presentes em concentrações suficientes para melhorar a função de barreira em equivalentes de pele cultivados *in vitro*. Em algumas formas de realização, a composição compreende ainda soro. Ainda noutras formas de realização, as composições compreendem ainda, cloreto de cálcio, hidrocortisona, toxina da cólera, insulina e adenina. Em formas de realização preferidas, a albumina de soro bovino é proporcionada a uma concentração de cerca de 0,1-10,0 mg/mL. Em outras formas de realização preferidas, o isoproterenol é proporcionado a uma concentração de cerca de 0,1-10,0 μ M. Ainda em outras formas de realização preferidas, a carnitina é proporcionada a uma concentração de cerca de 1,0-100,0 μ M. Em formas de realização preferidas adicionais, a serina é proporcionada a uma concentração de cerca de 1,0-100,0 μ M. Ainda em formas de realização preferidas adicionais, o ácido oleico é proporcionado a uma concentração de cerca de 1,0-100,0 μ M. Ainda em outras formas de realização preferidas, o ácido linoleico é proporcionado a uma concentração de cerca de 1,0-100,0 μ M. Em

algumas formas de realização preferidas, o ácido araquidónico é proporcionado a uma concentração de cerca de 1,0-100,0 μ M. Em outras formas de realização preferidas, o α -tocoferol é proporcionado a uma concentração de cerca de 0,1-10,0 μ M. Ainda em outras formas de realização preferidas, o ácido ascórbico é proporcionado a uma concentração de cerca de 0,005-5,0 mg/mL. Ainda em formas de realização preferidas adicionais, o factor de crescimento epidérmico é proporcionado a uma concentração de cerca de 0,1-10,0 ng/mL.

Descrição das Figuras

A Figura 1 é a sequência de ácidos nucleicos para Klf4 de murganho (SEQ ID N°: 1).

A Figura 2 é a sequência de ácidos nucleicos para GKLF humano (SEQ ID N°: 2)

A Figura 3 mostra Secreção de IL-1 α por culturas organotípicas de NIKS.

A Figura 4 proporciona uma representação dos poços de cultura de algumas formas de realização do presente pedido.

Definições

Como aqui utilizado, o termo "GKLF", quando utilizado em referência a uma proteína ou ácido nucleico refere-se a uma proteína ou ácido nucleico codificando uma proteína que partilha mais de cerca de 50% de identidade com a SEQ ID N°: 1 e/ou SEQ ID N°: 2 e liga-se ao elemento básico de transcrição do promotor do citocromo p450IAI. A actividade de ligação pode ser convenientemente ensaiada por um ensaio de desvio de gel de

mobibilidade electroforética utilizando o oligonucleótido GAGAAGGAGGCGTGGCCAAC (SEQ ID N°: 3), como descrito em Zhang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273(28): 17917-25 (1998). Deste modo, o termo GKLF abrange proteínas que são idênticas a GKLF de tipo selvagem e às que são derivadas de GKLF de tipo selvagem (e. g., variantes de GKLF ou genes quiméricos construídos com porções de regiões codificantes de GKLF).

Como aqui utilizado, a expressão “actividade de GKLF” refere-se a qualquer actividade de GKLF de tipo selvagem. O termo pretende abranger todas as actividades de GKLF.

Como aqui utilizado, as expressões “equivalente de pele” e “substituto de pele” são utilizadas com o mesmo significado para referirem uma cultura de queratinócitos derivada *in vitro* que se estratificou em epitélios escamosos, no que é designado uma cultura organotípica.

Como aqui utilizado, a expressão “equivalente dérmico” é utilizada para referir uma cultura derivada *in vitro* compreendendo células de colagénio e fibroblastos. Está contemplado que os “equivalentes dérmicos” podem servir como substratos para a diferenciação de queratinócitos numa cultura organotípica.

Como aqui utilizado, a expressão “interface de ar” refere-se à interface entre a atmosfera e meio líquido numa placa de cultura.

Como aqui utilizado a expressão “substancialmente aderido a uma parede lateral”, quando utilizada em referência a um equivalente dérmico, refere-se à aderência física de um

equivalente dérmico a uma parede substancialmente vertical, em oposição ao equivalente dérmico em contracção ou afastando-se da parede substancialmente vertical.

Como aqui utilizado, o termo cultura “organotípica” refere-se a uma cultura de tecidos tridimensional, onde as células cultivadas são utilizadas para reconstruir um tecido ou órgão *in vitro*.

Como aqui utilizado, a expressão “células NIKS” refere-se a células tendo as características das células depositadas como linha celular ATCC CRL-12191.

Como aqui utilizado, o termo “NHDF” refere-se a células tendo as características de fibroblastos dérmicos humanos normais.

Como aqui utilizado, a expressão “teor de ceramidas” refere-se a uma quantidade de ceramidas numa amostra de equivalente de pele, como ensaiada por cromatografia de camada fina de alta resolução.

Como aqui utilizado, a expressão “irritante de pele” refere-se a um composto que, quando aplicado na pele ou equivalentes de pele, deduz uma resposta celular caracterizada pela expressão de um “gene responsivo e irritante”. Os exemplos de irritantes de pele conhecidos incluem mas não estão limitados a SDS, calcipotriol e ácido trans-retinóico. a expressão “irritante de pele” também pretende abranger irritantes desconhecidos ou suspeitos, incluindo mas não limitados aos contidos em alguns fármacos, cosméticos e produtos de consumo.

Como aqui utilizado, a expressão “gene responsivo e irritante” refere-se a um gene que é expresso a um nível maior (e. g., como medido pelo nível de expressão de ARNm) na presença de um irritante de pele. Os exemplos de genes responsivos e irritantes incluem mas não estão limitados a Interleucina 8 e Interleucina 1 α . O termo “gene responsivo e irritante” também pretende abranger genes responsivos e irritantes desconhecidos (e. g., os identificados pelos métodos do presente pedido).

O termo “gene” refere-se a uma sequência de ácido nucleico (e. g., ADN) que compreende sequências codificantes necessárias para a produção de um polipéptido ou precursor (e. g., GKLF). O polipéptido pode ser codificado por uma sequência codificante de comprimento completo ou por qualquer porção da sequência codificante, desde que a actividade desejada ou propriedades funcionais (e. g., actividade enzimática, ligação de ligando, transdução de sinal, etc.) do fragmento ou de comprimento completo sejam retidas. O termo também abrange a região codificante de um gene estrutural e as sequências incluídas localizadas adjacentes à região codificante nas extremidades 5' e 3' para uma distância de cerca de 1 kb em cada extremidade, de modo a que o gene corresponda ao comprimento do ARNm de comprimento completo. As sequências que estão localizadas em 5' da região codificante e que estão presentes no ARNm são referidas como sequências não traduzidas 5'. As sequências que estão localizadas em 3' ou a montante da região codificante e que estão presentes no ARNm são referidas como sequências não traduzidas 3'. O termo “gene” abrange as formas de ADNc e genómicas de um gene. Uma forma genómica ou clone de um gene contém a região codificante interrompida com sequências não codificantes, designadas “intrões” ou “regiões intervenientes” ou “sequências intervenientes”. Os intrões são segmentos de um

gene que são transcritos em ARN nuclear (ARNhn); os intrões podem conter elementos regulatórios, tal como estimuladores. Os intrões são removidos ou “excisados” do transcrito nuclear ou primário; por conseguinte, os intrões estão ausentes no transcrito de ARN mensageiro (ARNm). O ARNm funciona durante a tradução para especificar a sequência ou ordem dos aminoácidos num polipéptido nascente.

Em particular, a expressão “gene de GKLF” refere-se à sequência nucleotídica de GKLF de comprimento completo (e. g., contida na SEQ ID N°: 2). Contudo, também se pretende que o termo abranja fragmentos da sequência de GKLF, assim como outros domínios na sequência nucleotídica de GKLF de comprimento completo. Além disso, as expressões “sequência nucleotídica de GKLF” ou “sequência polinucleotídica de GKLF” abrangem sequências de ADN, ADNc e ARN (e. g., ARNm).

Como aqui utilizado, o termo “matriz génica” refere-se a um suporte sólido (e. g., um filtro, uma lâmina de vidro ou um microchip) a que é afixada uma pluralidade de sequências de ácidos nucleicos. Como aqui utilizado, a expressão “matriz de expressão génica” refere-se a uma matriz génica para utilização na medição da expressão de genes que estão contidos na matriz. Em formas de realização preferidas, as sequências de ácidos nucleicos afixadas a uma matriz de expressão génica são sequências de ADNc.

Onde as sequências de aminoácidos sejam aqui enumeradas para referir uma sequência de aminoácidos de uma molécula de proteína de ocorrência natural, sequência de aminoácidos e termos semelhantes, tais como polipéptido ou proteína, não se destinam a limitar a sequência de aminoácidos à sequência de

aminoácidos nativa, completa, associada à molécula de proteína enumerada.

Além de conterem intrões, as formas genómicas de um gene também podem incluir sequências localizadas na extremidade 5' e 3' das sequências que estão presentes no transcrito de ARN. Estas sequências são referidas como sequências ou regiões "flanqueantes" (estas sequências flanqueantes estão localizadas 5' ou 3' às sequências não traduzidas presentes no transcrito de ARNm). A região flanqueante 5' pode conter sequências regulatórias, tais como promotores e estimuladores, que controlam ou influenciam a transcrição do gene. A região flanqueante 3' pode conter sequências que dirigem a terminação da transcrição, clivagem pós-transcricional e poliadenilação.

A expressão "de tipo selvagem" refere-se a um gene ou produto génico que tem as características desse gene ou produto génico quando isolado desde de uma fonte de ocorrência natural. Um gene de tipo selvagem é aquele que é mais frequentemente observado numa população e é, deste modo, arbitrariamente designado a forma "normal" ou "de tipo selvagem" do gene. Em contraste, os termos "modificado", "mutante" e "variante" referem-se a um gene ou produto génico que exhibe modificações em sequência e ou propriedades funcionais (*i. e.*, características alteradas), quando comparado com o gene ou produto génico de tipo selvagem. Importa notar que podem ser isolados mutantes de ocorrência natural; estes são identificados pelo facto de que, quando comparados com o gene ou produto génico de tipo selvagem, podem ter características alteradas.

Como aqui utilizado, as expressões "molécula de ácido nucleico codificando", "sequência de ADN codificando" e "ADN

codificando" referem-se à ordem ou sequência de desoxirribonucleótidos ao longo de uma cadeia de ácido desoxirribonucleico. A ordem destes desoxirribonucleótidos determina a ordem dos aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica (proteína). A sequência de ADN, deste modo, codifica para a sequência de aminoácidos.

Como aqui utilizado, as expressões "um oligonucleótido tendo uma sequência nucleotídica codificando um gene" e "polinucleótido tendo uma sequência nucleotídica codificando um gene" significam uma sequência de ácidos nucleicos compreendendo a região codificante de um gene ou, por outras palavras, a sequência de ácidos nucleicos que codifica um produto génico. A região codificante pode estar presente numa forma de ADNc, ADN genómico ou ARN. Quando presente numa forma de ADN, o oligonucleótido ou polinucleótido pode ser de cadeia única (*i. e.*, a cadeia sentido) ou de cadeia dupla. Elementos de controlo adequados, tais como estimuladores/promotores, junções de excisão, sinais de poliadenilação, etc., podem ser colocados em proximidade imediata com a região codificante do gene, se necessário para permitir apropriada iniciação de transcrição e/ou processamento correcto do transcrito de ARN primário. Alternativamente, a região codificante utilizada nos vectores de expressão do presente pedido pode conter estimuladores/promotores, junções de excisão, sequências intermédias, sinais de poliadenilação, etc., endógenos, ou uma combinação de elementos de controlo endógenos e exógenos.

Como aqui utilizado, a expressão "elemento regulatório" refere-se a um elemento genético que controla algum aspecto da expressão das sequências de ácidos nucleicos. Por exemplo, um promotor é um elemento regulatório que facilita a iniciação da

transcrição de uma região codificante ligada de modo operativo. Outros elementos regulatórios incluem sinais de excisão, sinais de poliadenilação, sinais de terminação, etc.

Como aqui utilizado, os termos "complementar" ou "complementaridade" são utilizados em referência a polinucleótidos (*i. e.*, uma sequência de nucleótidos) relacionados pelas regras de emparelhamento de bases. Por exemplo, a sequência "5'-A-G-T-3'" é complementar à sequência "3'-T-C-A-5'". A complementaridade pode ser "parcial", na qual apenas algumas das bases dos ácidos nucleicos têm correspondência de acordo com as regras de emparelhamento de bases. Ou, pode haver complementaridade "completa" ou "total" entre os ácidos nucleicos. O grau de complementaridade entre cadeias de ácido nucleico tem efeitos significativos na eficiência e força de hibridação entre cadeias de ácido nucleico. Isto é de importância particular em reacções de amplificação, assim como métodos de detecção que dependem da ligação entre ácidos nucleicos.

O termo "homologia" refere-se a um grau de complementaridade. Pode ter-se homologia parcial ou homologia completa (*i. e.*, identidade). Uma sequência parcialmente complementar é aquela que, pelo menos, inibe parcialmente uma sequência completamente complementar de se hibridar a um ácido nucleico alvo e é referida utilizando a expressão funcional "substancialmente homóloga". A expressão "inibição de ligação", quando utilizado em referência a ligação de ácido nucleico, refere-se a inibição da ligação causada por competição de sequências homólogas para ligação a uma sequência alvo. A inibição da hibridação da sequência completamente complementar à sequência alvo pode ser examinada utilizando um ensaio de

hibridação (transferência de Southern ou Northern, solução de hibridação e semelhantes) sob condições de baixa estringência. Uma sequência ou sonda substancialmente homóloga competirá e inibirá a ligação (*i. e.*, a hibridação) de um homólogo completo a um alvo sob condições de baixa estringência. Isto não quer dizer que as condições de baixa estringência sejam de modo a que a ligação não específica seja permitida; condições de baixa estringência requerem que a ligação de duas sequências entre si seja uma interacção específica (*i. e.*, selectiva). A ausência de ligação não específica pode ser testada pela utilização de um segundo alvo que não tem sequer um grau parcial de complementaridade (*e. g.*, inferior a cerca de 30% de identidade); na ausência de ligação não específica, a sonda não se irá hibridar ao segundo alvo não complementar.

Sabe-se bem na técnica que podem ser empregues numerosas condições equivalentes para compreender condições de baixa estringência; factores, tais como o comprimento e natureza (ADN, ARN, composição de bases) da sonda e natureza do alvo (ADN, ARN, composição de bases, presentes em solução ou imobilizados, etc.) e a concentração dos sais e outros componentes (*e. g.*, a presença ou ausência de formamida, sulfato de dextrano, polietilenoglicol), são considerados e a solução de hibridação pode ser variada para gerar condições de baixa estringência de hibridação diferentes, mas equivalentes às condições listadas acima. Além disso, conhecem-se na técnica condições que promovem a hibridação sob condições de elevada estringência (*e. g.*, aumentando a temperatura da hibridação e/ou etapas de lavagem, utilização de formamida na solução de hibridação, etc.).

Quando utilizado em referência a uma sequência de ácidos nucleicos de cadeia dupla, tais como um ADNc ou clone genómico,

a expressão “substancialmente homólogo” refere-se a qualquer sonda que pode hibridar-se a uma ou ambas as cadeias da sequência de ácidos nucleicos de cadeia dupla sob condições de baixa estringência, como descrito abaixo.

Quando utilizado em referência a uma sequência de ácidos nucleicos de cadeia única, a expressão “substancialmente homólogo” refere-se a qualquer sonda que pode hibridar-se (*i. e.*, é o complemento de) da sequência de ácidos nucleicos de cadeia única sob condições de baixa estringência, como descrito acima. -

Como aqui utilizado, a expressão “compete para ligação” é utilizada em referência a um primeiro polipéptido com uma actividade que se liga ao mesmo substrato que um segundo polipéptido com uma actividade, onde o segundo polipéptido é um variante do primeiro polipéptido ou um polipéptido relacionado ou dissemelhante. A eficiência (*e. g.*, cinética ou termodinâmica) de ligação pelo primeiro polipéptido pode ser igual, superior ou inferior à eficiência da ligação de substrato pelo segundo polipéptido. Por exemplo, a constante de ligação de equilíbrio (K_D) para ligação ao substrato pode ser diferente para os dois polipéptidos. O termo “ K_m ”, como aqui utilizado, refere-se à constante de Michaelis-Menton para uma enzima e é definido como a concentração do substrato específico a que uma dada enzima produz metade da sua velocidade máxima numa reacção catalisada por enzima.

Como aqui utilizado, o termo “hibridação” é utilizado em referência ao emparelhamento de ácidos nucleicos complementares. A hibridação e a força de hibridação (*i. e.*, a força da associação entre os ácidos nucleicos) são impactadas por

factores, tais como o grau de complementaridade entre os ácidos nucleicos, estringência das condições envolvidas, a T_m do híbrido formado e a razão G:C nos ácidos nucleicos.

Como aqui utilizado, o termo " T_m " é utilizado em referência à "temperatura de fusão". A temperatura de fusão é a temperatura a que uma população de moléculas de ácido nucleico de cadeia dupla se torna semi-dissociada em cadeias únicas. A equação para o cálculo da T_m de ácidos nucleicos é bem conhecida na técnica. Como indicado por referências padrão, uma estimativa simples do valor de T_m pode ser calculada pela equação: $T_m = 81,5 + 0,41(\% G + C)$, quando um ácido nucleico está em solução aquosa de NaCl a 1 M (Ver, e. g., Anderson e Young, *Quantitative Filter Hybridization*, em *Nucleic Acid Hybridization* [1985]). Outras referências incluem cálculos mais sofisticados que têm em conta características estruturais, assim como de sequência, para o cálculo da T_m .

Como aqui utilizado, o termo "estringência" é utilizado em referência às condições de temperatura, força iónica e a presença de outros compostos, tal como solventes orgânicos, sob os quais as hibridações de ácido nucleico são conduzidas. Os especialistas na técnica reconhecerão que as condições de "estringência" podem ser alteradas pela variação dos parâmetros acabados de descrever, individualmente ou em concertação. Com condições de "elevada estringência", o emparelhamento de bases de ácido nucleico ocorrerá apenas entre fragmentos de ácido nucleico que tenham uma elevada frequência de sequências de bases complementares (e. g., a hibridação sob condições de "elevada estringência" pode ocorrer entre homólogos com cerca de 85-100% de identidade, de um modo preferido, cerca de 70-100% de identidade). Com condições de média estringência, o

emparelhamento de bases de ácido nucleico ocorrerá entre ácidos nucleicos com uma frequência intermédia de sequências de bases complementares (e. g., a hibridação sob condições de “média estringência” pode ocorrer entre homólogos com cerca de 50-70% de identidade). Deste modo, condições de “fraca” ou “baixa” estringência são frequentemente requeridas com ácidos nucleicos que são derivados de organismos que são geneticamente diversos, visto que a frequência de sequências complementares é habitualmente menor.

“Condições de elevada estringência”, quando utilizado em referência a hibridação de ácido nucleico, compreende condições equivalentes a ligação ou hibridação a 42 °C, numa solução consistindo em 5X SSPE (NaCl a 43,8 g/L, NaH₂PO₄ H₂O a 6,9 g/L e EDTA a 1,85 g/L, pH ajustado para 7,4 com NaOH), SDS a 0,5%, reagente de Denhardt 5X e ADN de esperma de salmão desnaturado a 100 µg/mL, seguidas de lavagem numa solução compreendendo 0,1X SSPE, SDS a 1,0%, a 42 °C, quando é empregue uma sonda de cerca de 500 nucleótidos em comprimento.

“Condições de média estringência”, quando utilizado em referência a hibridação de ácido nucleico, compreende condições equivalentes a ligação ou hibridação a 42 °C, numa solução consistindo em 5X SSPE (NaCl a 43,8 g/L, NaH₂PO₄ H₂O a 6,9 g/L e EDTA a 1,85 g/L, pH ajustado para 7,4 com NaOH), SDS a 0,5%, reagente de Denhardt 5X e ADN de esperma de salmão desnaturado a 100 µg/mL, seguidas de lavagem numa solução compreendendo 1,0X SSPE, SDS a 1,0%, a 42 °C, quando é empregue uma sonda de cerca de 500 nucleótidos em comprimento.

“Condições de baixa estringência” compreende condições equivalentes a ligação ou hibridação a 42 °C, numa solução

consistindo em 5X SSPE (NaCl a 43,8 g/L, NaH₂PO₄ H₂O a 6,9 g/L e EDTA a 1,85 g/L, pH ajustado para 7,4 com NaOH), SDS a 0,1%, reagente de Denhardt 5X [o Denhardt 50X contém por 500 mL: 5 g de Ficoll (Tipo 400, Pharmacia), 5 g de BSA (Fracção V; Sigma)] e ADN de esperma de salmão desnaturado a 100 µg/mL, seguidas de lavagem numa solução compreendendo 5X SSPE, SDS a 0,1%, a 42 °C, quando é empregue uma sonda de cerca de 500 nucleótidos em comprimento.

As seguintes expressões são utilizadas para descrever as relações de sequência entre dois ou mais polinucleótidos: “sequência de referência”, “identidade de sequência”, “percentagem de identidade de sequência” e “identidade substancial”. Uma “sequência de referência” é uma sequência definida utilizada como uma base para uma comparação de sequência; uma sequência de referência pode ser um subconjunto de uma sequência maior, por exemplo, como um segmento de uma sequência de ADNc de comprimento completo, dada numa listagem de sequências ou pode compreender uma sequência génica completa. Em geral, uma sequência de referência tem, pelo menos, 20 nucleótidos em comprimento, frequentemente, pelo menos, 25 nucleótidos em comprimento e, frequentemente, pelo menos, 50 nucleótidos em comprimento. Visto que dois polinucleótidos podem cada (1) compreender uma sequência (*i. e.*, uma porção da sequência polinucleotídica completa) que é semelhante entre os dois polinucleótidos e (2) pode compreender, ainda, uma sequência que é divergente entre os dois polinucleótidos, as comparações de sequência entre dois (ou mais) polinucleótidos são, tipicamente, realizadas pela comparação de sequências dos dois polinucleótidos ao longo de uma “janela de comparação” para identificar e comparar regiões locais de semelhança de sequência. Uma “janela de comparação”, como aqui utilizado,

refere-se a um segmento conceptual de, pelo menos, 20 posições nucleotídicas contíguas, em que uma sequência polinucleotídica pode ser comparada a uma sequência de referência de, pelo menos, 20 nucleótidos contíguos e em que a porção da sequência polinucleotídica na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (*i. e.*, lacunas) de 20 por cento ou menos, em comparação à sequência de referência (que não compreende adições ou deleções) para alinhamento óptimo das duas sequências. O alinhamento óptimo de sequências para alinhamento de uma janela de comparação pode ser conduzido pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman [Smith e Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)], pelo algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch [Needleman e Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)], pelo método de pesquisa para semelhança de Pearson e Lipman [Pearson e Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988)], por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Pacote de Software do Wisconsin Genetics, Lançamento 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) ou por inspecção e o melhor alinhamento (*i. e.*, resultando na percentagem de homologia mais elevada ao longo da janela de comparação), gerado pelos diversos métodos, é seleccionado. A expressão "identidade de sequência" significa que duas sequências polinucleotídicas são idênticas (*i. e.*, numa base de nucleótido-por-nucleótido) ao longo da janela de comparação. A expressão "percentagem de identidade de sequência" é calculado pela comparação de duas sequências alinhadas de modo óptimo, ao longo da janela de comparação, determinação do número de posições em que a base de ácido nucleico idêntica (*e. g.*, A, T, C, G, U ou I) ocorre em ambas as sequências, para produzir o número de posições correspondentes, divisão do número de posições correspondentes pelo número total de posições na janela de comparação (*i. e.*, o

tamanho de janela) e multiplicação do resultado por 100, para produzir a percentagem de identidade de sequência. As expressões “identidade substancial”, como aqui utilizado, denotam uma característica de uma sequência polinucleotídica, em que o polinucleótido compreende uma sequência que tem, pelo menos, 85 por cento de identidade de sequência, de um modo preferido, pelo menos, 90 a 95 por cento de identidade de sequência, de um modo mais habitual, pelo menos, 99 por cento de identidade de sequência, em comparação com uma sequência de referência ao longo de uma janela de comparação de, pelo menos, 20 posições nucleotídicas, frequentemente, ao longo de uma janela de, pelo menos, 25-50 nucleótidos, em que a percentagem de identidade de sequência é calculada pela comparação da sequência de referência à sequência polinucleotídica que pode incluir deleções ou adições que totalizam 20 por cento ou menos da sequência de referência ao longo da janela de comparação. A sequência de referência pode ser um subconjunto de uma sequência maior, por exemplo, como um segmento das sequências de comprimento completo das composições do presente pedido (e. g., GKLF).

Como aplicado a polipeptídeos, a expressão “identidade substancial” significa que duas sequências peptídicas, quando optimamente alinhadas, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT utilizando ponderações de lacuna pré-definidas, partilham, pelo menos, 80 por cento de identidade de sequência, de um modo preferido, pelo menos, 90 por cento de identidade de sequência, de um modo mais preferido, pelo menos, 95 por cento de identidade de sequência ou mais (e. g., 99 por cento de identidade de sequência). De um modo preferido, as posições de resíduos que não são idênticas diferem em substituições conservativas de aminoácidos. As substituições conservativas de aminoácidos referem-se à permutabilidade de resíduos tendo

cadeias laterais semelhantes. Por exemplo, um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais alifáticas é glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais de hidroxilo alifáticas é serina e treonina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais contendo amida é asparagina e glutamina; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais aromáticas é fenilalanina, tirosina e triptofano; um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais básicas é lisina, arginina e histidina; e um grupo de aminoácidos tendo cadeias laterais contendo enxofre é cisteína e metionina. Os grupos de substituição conservativa de aminoácidos preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina e asparagina-glutamina.

Como aqui utilizado, a expressão “molécula de ADN recombinante”, como aqui utilizado, refere-se a uma molécula de ADN que é constituída por segmentos de ADN unidos em conjunto por meio de técnicas biológicas moleculares.

O termo “isolado”, quando utilizado em relação a um ácido nucleico, como em “um oligonucleótido isolado” ou “polinucleótido isolado”, refere-se a uma sequência de ácidos nucleicos que é identificada e separada de, pelo menos, um ácido nucleico contaminante com o qual está habitualmente associada na sua fonte natural. O ácido nucleico isolado está presente numa forma ou configuração que é diferente daquela na qual é encontrada na natureza. Em contraste, ácidos nucleicos não isolados são ácidos nucleicos, tais como ADN e ARN, verificados no estado em que existem na natureza. Por exemplo, uma dada sequência de ADN (e. g., um gene) é verificada no cromossoma de célula hospedeira na proximidade de genes vizinhos; as

sequências de ARN, tal como uma sequência específica de ARNm codificando uma proteína específica, são verificadas na célula como uma mistura com numerosos outros ARNm que codificam um sem-número de proteínas. Contudo, o ácido nucleico isolado codificando GKLF inclui, a título exemplificativo, esse ácido nucleico em células expressando habitualmente GKLF onde o ácido nucleico está numa localização cromossômica diferente da das células naturais ou está, de outro modo, flanqueado por uma sequência de ácidos nucleicos diferente da verificada na natureza. O ácido nucleico, oligonucleótido ou polinucleótido isolados podem estar presentes na forma de cadeia única ou cadeia dupla. Quando um ácido nucleico, oligonucleótido ou polinucleótido isolado se destina a ser utilizado para expressar uma proteína, o oligonucleótido ou polinucleótido conterá, no mínimo, a cadeia sentido ou codificante (*i. e.*, o oligonucleótido ou polinucleótido pode ser de cadeia única), mas pode conter as cadeias sentido e anti-sentido (*i. e.*, o oligonucleótido ou polinucleótido pode ser de cadeia dupla).

Como aqui utilizado, o termo “porção”, quando em referência a uma sequência nucleotídica (como em “uma porção de uma dada sequência nucleotídica”), refere-se a fragmentes dessa sequência. Os fragmentos podem variar em tamanho desde quatro nucleótidos até à sequência nucleotídica integral menos um nucleótido (10 nucleótidos, 20, 30, 40, 50, 100, 200, etc.).

Como aqui utilizado, a expressão “região codificante”, quando utilizado em referência a gene estrutural, refere-se às sequências nucleotídicas que codificam os aminoácidos verificados no polipéptido nascente, como resultado de tradução de uma molécula de ARNm. A região codificante está limitada, em eucariotas, no lado 5’ pelo tripleto nucleotídico “ATG” que

codifica a metionina iniciadora e no lado 3' por um dos três tripletos que especificam códons de terminação (*i. e.*, TAA, TAG, TGA).

Como aqui utilizado, a expressão "purificado" ou "para purifica" refere-se à remoção de contaminantes de uma amostra.

Como aqui utilizado, o termo "vector" é utilizado em referência a moléculas de ácido nucleico que transferem segmento(s) de ADN de uma célula para outra. O termo "transportador" é, por vezes, utilizado com o mesmo significado que "vector".

A expressão "vector de expressão", como aqui utilizada, refere-se a uma molécula de ADN recombinante contendo uma sequência codificante desejada e sequências de ácidos nucleicos apropriadas, necessárias para a expressão da sequência codificante ligada de modo operativo num organismo hospedeiro particular. As sequências de ácidos nucleicos necessárias para expressão em procariotas incluem, habitualmente, um promotor, um operador (opcional) e um sítio de ligação de ribossoma, frequentemente juntamente com outras sequências. As células eucarióticas são conhecidas por utilizarem promotores, estimuladores e sinais de terminação e poliadenilação.

Como aqui utilizado, a expressão "célula hospedeira" refere-se a qualquer célula eucariótica ou procariótica (*e. g.*, células bacterianas, tais como *E. coli*, células de levedura, células mamíferas, células aviárias, células anfíbias, células vegetais, células de peixes e células de insecto), quer localizadas *in vitro* ou *in vivo*. Por exemplo, as células hospedeiras podem estar localizadas num animal transgénico.

Os termos “sobreexpressão” e “sobreexpressando” e equivalentes gramaticais, são utilizados em referência a níveis de ARNm para indicar um nível de expressão de, aproximadamente, 3 vezes mais elevada do que a tipicamente observada num dado tecido num animal de controlo ou não transgénico. Os níveis de ARNm são medidos utilizando qualquer de várias técnicas conhecidas dos especialistas na técnica, incluindo mas não limitadas a análise de transferência de Northern. Controlos apropriados estão incluídos na transferência de Northern para controlar para diferenças numa quantidade de ARN carregado de cada tecido analisado (e. g., a quantidade de ARNr 28S, um abundante transcrito de ARN presente essencialmente na mesma quantidade em todos os tecidos, presente em cada amostra, pode ser utilizada como um meio de normalização ou padronização do sinal específico de ARNm de GKLF observado em transferências de Northern). A quantidade de ARNm presente na banda correspondendo em tamanho ao ARN de transgene de GKLF correctamente excisado é quantificada; outras espécies de ARN menores que se hibridam à sonda de transgene não são consideradas na quantificação da expressão do ARNm transgénico.

O termo “transfecção”, como aqui utilizado, refere-se à introdução de ADN estranho em células eucarióticas. A transfecção pode ser alcançada por uma variedade de meios conhecidos na técnica, incluindo co-precipitação de ADN por fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextrano, transfecção mediada por polibreno, electroporação, micro-injecção, fusão de lipossomas, lipofecção, fusão de protoplastos, infecção retroviral e biolística.

O termo “transfecção estável” ou “transfectado de um modo estável” refere-se à introdução e integração de ADN estranho no genoma da célula transfectada. O termo “transfectante estável” refere-se a uma célula que integrou, de um modo estável, ADN estranho no ADN genómico.

A expressão “transfecção transiente” ou “transfectado de um modo transiente” refere-se à introdução de ADN estranho numa célula onde o ADN estranho não se integra no genoma da célula transfectada. O ADN estranho persiste no núcleo da célula transfectada durante vários dias. Durante este tempo, o ADN estranho é submetido aos controlos regulatórios que governam a expressão de genes endógenos nos cromossomas. A expressão “transfectante transiente” refere-se a células que absorveram ADN estranho mas não integraram este ADN.

A expressão “co-precipitação por fosfato de cálcio” refere-se a uma técnica para a introdução de ácidos nucleicos numa célula. A absorção de ácidos nucleicos por células é melhorada quando o ácido nucleico é apresentado como um co-precipitado de ácido nucleico por fosfato de cálcio. A técnica original de Graham e van der Eb (Graham e van der Eb, *Virology*, 52:456 [1973]) foi modificada por vários grupos para otimizar as condições para tipos particulares de células. Estas numerosas modificações estão ao corrente da técnica.

Uma “composição compreendendo uma dada sequência polinucleotídica”, como aqui utilizado, refere-se em geral a qualquer composição contendo a sequência polinucleotídica dada. A composição pode compreender uma solução aquosa. As composições compreendendo sequências polinucleotídicas codificando GKLf (e. g., SEQ ID N°: 2) ou seus fragmentos podem ser empregues

como sondas de hibridação. Neste caso, as sequências polinucleotídicas codificando GKLF são, tipicamente, empregues numa solução aquosa contendo sais (e. g., NaCl), detergentes (e. g., SDS) e outros componentes (e. g., solução de Denhardt, leite seco, ADN de esperma de salmão, etc.).

A expressão “composto de teste” refere-se a qualquer entidade química, medicamento, fármaco e semelhantes que pode ser utilizado para tratar ou prevenir uma doença, enfermidade, moléstia ou distúrbio de função corporal ou, de outro modo, alterar o estado fisiológico ou celular de uma amostra. Os compostos de teste compreendem compostos terapêuticos conhecidos e potenciais. Um composto de teste pode ser determinado como sendo terapêutico por rastreio, utilizando os métodos de rastreio do presente pedido. Um “composto terapêutico conhecido” refere-se a um composto terapêutico que mostrou (e. g., através de ensaios animais ou experiência anterior com administração a humanos) ser eficaz nesse tratamento ou prevenção.

O termo “amostra”, como aqui utilizado, é utilizado no seu sentido mais amplo. Uma amostra suspeita de conter um cromossoma humano ou sequências associadas a um cromossoma humano pode compreender uma célula, cromossomas isolados de uma célula (e. g., uma propagação de cromossomas na metáfase), ADN genómico (em solução ou ligado a um suporte sólido, tal como para análise de transferência de Southern), ARN (em solução ou ligado a um suporte sólido, tal como para análise de transferência de Northern), ADNc (em solução ou ligado a um suporte sólido) e semelhantes. Uma amostra suspeita de conter uma proteína pode compreender uma célula, uma porção de um tecido, um extracto contendo uma ou mais proteínas e semelhantes.

Como aqui utilizado, o termo “resposta”, quando utilizado em referência a um ensaio, refere-se à geração de um sinal detectável (e. g., acumulação de proteína repórter, aumento na concentração de iões, acumulação de um produto químico detectável).

Como aqui utilizado, a expressão “gene repórter” refere-se a um gene codificando uma proteína que pode ser ensaiada. Os exemplos de genes repórter incluem mas não estão limitados a luciferase (Ver, e. g., de Wet et al., *Mol. Cell. Biol.* 7:725 [1987] e Pat U.S. Nº 6074859; 5976796; 5674713; e 5618682), proteína verde fluorescente (e. g., Acesso GenBank Número U43284; um número de variantes de GFP está comercialmente disponível a partir de CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA), cloranfenicol acetiltransferase, galactosidase, fosfatase alcalina e peroxidase de rábano.

Como aqui utilizado, a expressão “construção de gene repórter responsivo e irritante” refere-se a uma construção compreendendo um gene repórter ligado de modo operativo a uma região regulatória de um gene responsivo e irritante.

Descrição da Invenção

A presente invenção refere-se a composições como definidas nas reivindicações. Noutras formas de realização, a presente invenção proporciona composições compreendendo substitutos de pele compreendendo construções de gene repórter (i. e., construções de gene repórter responsivo e irritante), como definido nas reivindicações.

A pele humana protege o corpo de insultos ambientais, tais como substâncias químicas e microrganismos. Também é crítica para a prevenção da perda de água dos nossos corpos. Os defeitos na função de barreira da pele têm efeitos prejudiciais, conduzindo à entrada de substâncias venenosas, infecção ou perda de água grave. Por vezes, é desejável melhorar a função de barreira da pele, por razões médicas, de cuidados infantis ou cosméticas, enquanto noutras vezes, seria vantajoso diminuir a barreira de permeabilidade; por exemplo, para administrar fármacos transdermicamente. As empresas farmacêuticas, cosméticas e produtos de consumo têm todos produtos que podem entrar em contacto com a pele. Estas empresas necessitam de saber antecipadamente no processo de desenvolvimento se o seu composto ou formulação irá afectar a função de barreira essencial da pele. O tecido de pele excisado tem sido utilizado para medição da absorção percutânea mas foi notado na literatura um número de problemas com esta preparação. Existem diferenças em absorção entre a pele humana e animal que podem resultar em resultados enganadores e a disponibilidade de tecido humano é variável. Também existem pressões políticas e sociais crescentes para eliminar ou reduzir o número de animais sendo utilizado para testes de segurança.

Estas dificuldades e a crescente necessidade de compreender as propriedades de permeabilidade de novas formulações e potencial terapêutica transdérmica conduziram a muitos estudos para melhorar as propriedades de permeabilidade de culturas de equivalente de pele *in vitro*. O desenvolvimento de um substituto de pele cultivado que recapitula as propriedades de barreira da pele humana também proporcionará uma melhor fonte de tecido sintético para terapia de queimaduras. A disponibilidade de substitutos de pele cultivados que se assemelham mais

estritamente a pele humana facilitará a testagem de cosméticos, fármacos e outros compostos tópicos, pela redução da dependência dos testes destes produtos em animais.

Os epitélios escamosos estratificados, tais como epitélios de pele e orais, são tecidos de renovação em multicamada compostos, principalmente, por queratinócitos. Os queratinócitos diferenciados são continuamente perdidos da superfície e substituídos pela proliferação de queratinócitos basais. A taxa a que uma chamada basal se inicia e completa o seu programa de diferenciação parece ser rigorosamente regulada, embora os controlos moleculares para essa regulação sejam definidos por doença (Fuchs, *J. Cell. Sci. Suppl.*, 17: 197-208 (1993)). *In vivo*, as fases finais do processo de diferenciação terminal são caracterizadas por numerosas alterações, incluindo empacotamento de filamento intermediário de queratina mediado por filagrina e libertação de lípidos de grânulos de revestimento de membrana no espaço intercelular (Schurer *et al.*, *Dermatologica*, 183: 77-94 (1991)). O envelope cornificado, outra estrutura de diferenciação terminal consistindo em várias proteínas que estão covalentemente reticuladas pela acção de transglutaminases dependentes de cálcio, também é formado em queratinócitos em diferenciação (Aeschlimann *et al.*, *Thrombosis & Haemostasis*, 71(4): 402-15 (1994); Reichert *et al.*, The cornified envelope: a key structure of terminally differentiating keratinocytes, em *Molecular Biology of the Skin*, M. Darmon, Editor. 1993, Academic Press, Inc.: San Diego. 107-150 (1993)). Na epiderme, os queratinócitos perdem organelos intracelulares e sofrem enucleação nas camadas superiores do tecido, formando um "invólucro morto" com elevada resistência à tracção. Os mecanismos moleculares que governam a enucleação e diferenciação terminal de queratinócitos são pouco compreendidos. Estudos

((Sachsenmeier et al., *J. Biol. Chem.*, 271: 5-8 (1996); Hines et al., *Promega Notes*, 59: p. 30-36 (1996); Hines et al., *J. Biol. Chem.*, 271(11): 6245-6251 (1996); Polakowska et al., *Developmental Dynamics*, 199(3): 176-88 (1994); Haake et al., *J. Invest. Derm. Symp. Proc.*, 3: 28-35 (1998)) sugerem que a diferenciação terminal em queratinócitos pode constituir uma forma especial de morte celular apoptótica.

A pele humana é composta por uma camada dérmica contendo fibroblastos embebidos numa matriz de proteína extracelular e uma camada epidérmica consistindo, principalmente, em queratinócitos que se diferenciam para formar a camada de pele impermeável mais externa. A função primária da pele humana é proporcionar uma barreira física para prevenir a perda excessiva de fluido corporal devido à evaporação. A função de barreira está localizada no estrato córneo da pele. O estrato córneo foi descrito como uma matriz impermeável de células preenchidas com queratina embebidas numa matriz de lípido, análoga a uma parede de tijolo. Os componentes críticos da barreira de estrato córneo são os lípidos depositados pelos queratinócitos durante a formação do estrato córneo. No estrato granuloso, os queratinócitos contêm grânulos de querato-hialina e corpos lamelares. Na interface estrato granuloso/estrato córneo, os corpos lamelares fundem-se com a membrana plasmática e extrusam os seus conteúdos lipídicos para o espaço intercelular. Um número de enzimas também é libertado que serve para processar fosfolípidos e glucosilceramidas em ácidos gordos e ceramidas, respectivamente. Os lípidos extracelulares do estrato córneo são dispostos em estruturas multilamelares que rodeiam os envelopes cornificados preenchidos com queratina produzidos a partir dos queratinócitos. Os lípidos do estrato córneo compreendem 10-15% do peso seco do tecido e consistem, principalmente, (em peso,)

em ceramidas (50%), colesterol (25%) e ácidos gordos livres (10%) em quantidades aproximadamente equimolares (Wertz et al., *Chem. Phys. Lipids.*, 91(2): 85-96 (1998)). Estes lípidos são derivados, principalmente, de biossíntese nos queratinócitos. Uma porção das ceramidas tem o papel pouco habitual de formação de ligações covalentes com grupos à superfície dos envelopes cornificados, incluindo ligações a involucrina. Esta hidroxiceramida ómega ligada covalentemente forma uma monocamada lipídica circundando a superfície externa das células cornificadas. O papel preciso desta estrutura é desconhecido. Recentemente, a importância das hidroxiceramidas ómega na função de barreira foi demonstrada pela inibição da sua formação em pele de murganho sem pêlo com um inibidor da hidroxilase ómega CYP4 P-450 (Behne et al., *J. Invest. Dermatol.*, 114(1): 185-92 (2000)).

Após a descoberta de que o tetróxido de ruténio poderia ser utilizado para revelar as lamelas em microscopia electrónica, a análise da ultra-estrutura do estrato córneo proporcionou conhecimentos importantes sobre a qualidade do estrato córneo. Por exemplo, os estudos examinaram a presença de corpos lamelares no estrato granuloso, a excreção apropriada de teores de corpos lamelares na interface estrato granuloso/estrato córneo e a presença de bandas alternadas electronicamente densas e electronicamente luzentes das lamelas lipídicas. A microscopia electrónica também revela desmossomas electronicamente densos no estrato córneo, ocupando ~15% dos espaços intercelulares e, possivelmente, importantes na aderência célula-célula.

O presente pedido proporciona substitutos de pele tendo função de barreira melhorada e descreve composições e métodos para preparação de substitutos de pele tendo função de barreira

melhorada. Por razões de conveniência, a descrição da invenção é apresentada nas seguintes secções: A) Fontes de Queratinócitos e Outras Células para Criação de Substitutos de Pele Tendo Função de Barreira Melhorada; B) Condições de Cultura para Criação de Função de Barreira Melhorada em Substitutos de Pele; C) Modificação Genética de Células para Função de Barreira Melhorada; e D) Utilizações de Substitutos de Pele Tendo Função de Barreira Melhorada.

A. Fontes de Queratinócitos e Outras Células para Criação de Substitutos de Pele Tendo

Está contemplado que os métodos do presente pedido podem ser utilizados para criar substitutos de pele tendo função de barreira melhorada. Em geral, qualquer fonte de células ou linha celular que se possa estratificar em epitélios escamosos é útil no presente pedido. Consequentemente, o presente pedido não está limitado à utilização de qualquer fonte particular de células que são capazes de se diferenciarem em epitélios escamosos. De facto, o presente pedido contempla a utilização de uma variedade de linhas celulares e fontes que podem diferenciar-se em epitélios escamosos, incluindo queratinócitos primários e imortalizados. As fontes de células incluem queratinócitos e fibroblastos dérmicos biopsiados de dadores humanos e cadavéricos (Auger *et al.*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal* 36:96-103; Pat. U.S. N° 5968546 e 5693332), prepúcios neonatais (Asbill *et al.*, *Pharm. Research* 17(9): 1092-97 (2000); Meana *et al.*, *Burns* 24:621-30 (1998); Pat. U.S. N° 4485096; 6039760; e 5536656), e linhas celulares de queratinócitos imortalizados, tais como células NM1 (Baden, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 23(3):205-213 (1987)), células HaCaT (Boucamp *et al.*, *J. cell.*

Boil. 106:761-771 (1988)); e células NIKS(Linha celular BC-1-Ep/SL; Pat. U.S. Nº 5989837 ATCC CRL-12191). Cada destas linhas celulares pode ser cultivada ou geneticamente modificada como descrito abaixo, de modo a melhorar a função de barreira do equivalente de pele resultante.

Em formas de realização particularmente preferidas, são utilizadas células NIKS. A descoberta de uma nova linha celular de queratinócito humano (queratinócitos imortalizados quase diplóides ou NIKS) proporciona uma oportunidade para manipular geneticamente queratinócitos humanos para novos métodos de testagem *in vitro*. Uma vantagem única das células NIKS é que estas são uma fonte consistente de queratinócitos humanos isentos de patogénios, geneticamente uniformes. Por esta razão, são úteis para a aplicação de abordagens de engenharia genética e expressão génica genómica, para proporcionar culturas de equivalentes de pele com propriedades mais semelhantes a pele humana. Esses sistemas proporcionarão uma importante alternativa à utilização de animais para testagem de compostos e formulações. A linha celular de queratinócitos de NIKS, identificada e caracterizada na Universidade de Wisconsin, é não tumorigénica, exibe um cariótipo estável e exibe diferenciação normal em cultura de monocamada e organotípica. As células NIKS formam equivalentes de pele totalmente estratificados em cultura. Estas culturas não são distinguíveis por todos os critérios testados até agora de culturas organotípicas formadas a partir de queratinócitos humanos primários. Contudo, contrariamente a células primárias, as células NIKS imortalizadas continuarão a proliferar em cultura de monocamada indefinidamente. Isto proporciona uma oportunidade para manipular geneticamente as células e isolar novos clones de

células com novas propriedades úteis (Allen-Hoffmann *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 114(3): 444-455 (2000)).

As células NIKS surgiram da estirpe BC-1-Ep de queratinócitos de prepúcio neonatal humano, isolado de um bebê masculino aparentemente normal. Em passagens iniciais, as células BC-1-Ep não exibiram características de morfologia ou crescimento que fossem atípicas para queratinócitos humanos normais cultivados. As células BC-1-Ep cultivadas exibiram estratificação, assim como características de morte celular programada. Para determinar a esperança de vida replicativa, as células BC-1-Ep foram cultivadas serialmente até senescência, em meio de crescimento de queratinócitos corrente, a uma densidade de 3×10^5 células por placa de 100 mm e passadas em intervalos semanais (aproximadamente, uma divisão de 1:25). Na passagem 15, a maioria dos queratinócitos na população pareceu senescente, como avaliado pela presença de numerosas colônias abortivas que exibiam células grandes, achatadas. Contudo, na passagem 16, eram evidentes queratinócitos exibindo um tamanho de célula pequeno. Na passagem 17, estavam presentes apenas queratinócitos de pequeno tamanho na cultura e não eram evidentes queratinócitos grandes, senescentes. A população resultante de queratinócitos pequenos que sobreviveu a este putativo período de crise parecia morfológicamente uniforme e produziu colônias de queratinócitos exibindo características típicas de queratinócitos, incluindo adesão célula-célula e aparente produção de escama. Os queratinócitos que sobreviveram à senescência foram cultivados serialmente, a uma densidade de 3×10^5 células por placa de 100 mm. Tipicamente, as culturas atingiram uma densidade celular de, aproximadamente, 8×10^6 células no espaço de 7 dias. Esta taxa de crescimento celular estável foi mantida através de, pelo menos, 59 passagens,

demonstrando que as células tinham alcançado a imortalidade. Os queratinócitos que emergiram da população de senescência original foram originalmente designados BC-1-Ep/Linha Espontânea e são agora designados NIKS. A linha celular de NIKS foi rastreada para a presença de sequências de ADN provirais para HIV-1, HIV-2, EBV, CMV, HTLV-1, HTLV-2, HBV, HCV, parvovírus B-19, HPV-16 e HPV-31, utilizando análise de PCR ou de Southern. Nenhum destes vírus foi detectado.

A análise cromossômica foi realizada nas células BC-1-Ep parentais na passagem 3 e as células NIKS nas passagens 31 e 54. As células BC-1-Ep parentais têm um complemento cromossômico normal de 46, XY. Na passagem 31, todas as células NIKS continham 47 cromossomas com um isocromossoma extra do braço longo do cromossoma 8. Não foram detectadas outras anormalidades cromossômicas grosseiras ou cromossomas marcadores. Na passagem 54, todas as células continham o isocromossoma 8.

As impressões digitais de ADN para a linha celular de NIKS e os queratinócitos de BC-1-Ep são idênticas em todos os doze loci analisados, demonstrando que as células NIKS surgiram da população parental de BC-1-Ep. As probabilidades de a linha celular de NIKS ter a impressão digital de ADN de BC-1-Ep parental por acaso aleatório é 4×10^{-16} . As impressões digitais de ADN de três fontes diferentes de queratinócitos humanos, ED-1-Ep, SCC4 e SCC13y, são diferentes do padrão de BC-1-Ep. Estes dados também mostram que os queratinócitos isolado de outros humanos, ED-1-Ep, SCC4 e SCC13y, não são relacionados com as células BC-1-Ep ou entre si. Os dados de impressão digital de ADN de NIKS proporcionam uma forma inequívoca de identificar a linha celular de NIKS.

A perda da função de p53 está associada a um potencial proliferativo melhorado e frequência aumentada de imortalidade em células cultivadas. A sequência de p53 nas células NIKS é idêntica às sequências de p53 publicadas (acesso GenBank número: M14695). Em humanos, o p53 existe em duas formas polimórficas predominantes distinguidas pelo aminoácido no codão 72. Ambos os alelos de p53 nas células NIKS são de tipo selvagem e têm a sequência CGC no codão 72, que codifica para uma arginina. A outra forma comum de p53 tem uma prolina nesta posição. A sequência integral de p53 nas células NIKS é idêntica às células progenitoras BC-1-Ep. Também se verificou que o Rb era de tipo selvagem em células NIKS.

O crescimento independente de ancoragem está altamente correlacionado com a tumorigenicidade *in vivo*. Por esta razão, as características de crescimento independente de ancoragem das células NIKS em ágar ou meio contendo metilcelulose foram investigadas. Após 4 semanas em meio contendo ágar ou metilcelulose, as células NIKS permaneceram como células únicas. Os ensaios foram continuados durante um total de 8 semanas para detectar variantes de crescimento lento das células NIKS. Não foi observado nenhum.

Para determinar a tumorigenicidade dos queratinócitos de BC-1-Ep parentais e a linha celular de queratinócitos de NIKS imortal, as células foram injectadas nos flancos de murganhos nus atímicos. A linha celular de carcinoma espinocelular humano, SCC4, foi utilizada como um controlo positivo para produção de tumor nestes animais. A injeção de amostras foi concebida de modo a que os animais recebessem as células SCC4 num flanco e os queratinócitos de BC-1-Ep parentais ou as células NIKS no flanco oposto. Esta estratégia de injeção eliminava a variação de

animal para animal na produção de tumor e confirmava que os murganhos suportariam o crescimento vigoroso de células tumorigênicas. Nem os queratinócitos de BC-1-Ep parentais (passagem 6) nem os queratinócitos de NIKS (passagem 35) produziram tumores em murganhos nus atímicos.

As células NIKS foram analisadas para a capacidade de sofrerem diferenciação em cultura de superfície e cultura organotípica. Para as células em cultura de superfície, um marcador de diferenciação escamosa, a formação de envelopes cornificados foi monitorizada. Em queratinócitos humanos cultivados, as fases iniciais da disposição de envelope cornificado resultam na formação de uma estrutura imatura, composta por involucrina, cistatina α e outras proteínas, que representam o terço mais interno do envelope cornificado maduro. Menos de 2% dos queratinócitos das células BC-1-Ep aderentes ou a linha celular de NIKS produziram envelopes cornificados. Esta verificação é consistente com estudos anteriores demonstrando que os queratinócitos subconfluentes, em crescimento activo, produzem menos de 5% de envelopes cornificados. Para determinar se a linha celular de NIKS é capaz de produzir envelopes cornificados quando induzida a diferenciar-se, as células foram removidas da cultura de superfície e suspensas, durante 24 horas, em meio tornado semi-sólido com metilcelulose. Muitos aspectos da diferenciação terminal, incluindo expressão diferencial de queratinas e formação de envelope cornificado, podem ser desencadeados *in vitro* por perda de adesão de queratinócito de célula-célula e célula-substrato. Os queratinócitos de NIKS produziram tantos e, habitualmente, mais envelopes cornificados do que os queratinócitos parentais. Estas constatações demonstram que os queratinócitos de NIKS não são

defeituosos na sua capacidade de iniciarem a formação deste tipo de estrutura de diferenciação específica de tipo de célula.

Para confirmar que os queratinócitos de NIKS podem sofrer diferenciação escamosa, as células foram cultivadas em cultura organotípica. As culturas de queratinócitos cultivados em substratos de plástico e submersos em meio replicaram-se mas exibiram diferenciação limitada. Especificamente, os queratinócitos humanos tornam-se confluentes e sofrem estratificação limitada, produzindo uma folha consistindo em 3 ou mais camadas de queratinócitos. Com microscopia óptica e electrónica existem diferenças surpreendentes entre a arquitectura das folhas em multicamada formadas em cultura de tecidos e pele humana intacta. Em contraste, as técnicas de cultura organotípica permitem o crescimento e diferenciação de queratinócitos sob condições de tipo *in vivo*. Especificamente, as células aderem a um substrato fisiológico, consistindo em fibroblastos dérmicos embebidos na base de colagénio fibrilar. A cultura organotípica é mantida na interface ar-meio. Deste modo, as células nas folhas superiores estão expostas ao ar, enquanto as células basais em proliferação permanecem mais próximo do gradiente de nutrientes, proporcionado por difusão através do gel de colagénio. Nestas condições, a correcta arquitectura de tecido é formada. Várias características de uma epiderme em diferenciação normal são evidentes. Nas células parentais e na linha celular de NIKS uma única camada de células basais cubóides permanece na junção da epiderme e do equivalente dérmico. A morfologia arredondada e elevada razão nuclear para citoplasma são indicativas de uma população de queratinócitos dividindo-se activamente. Na epiderme humana normal, à medida que as células basais se dividem dão origem a células filhas que migram para cima até às camadas em diferenciação do tecido. As

células filhas aumentam em tamanho e tornam-se achatadas e escamosas. Eventualmente, estas células sofrem enucleação e formam estruturas cornificadas, queratinizadas. Este processo de diferenciação normal é evidente nas camadas superiores das células parentais e das células NIKS. O surgimento de células escamosas achatadas é evidente nas camadas superiores dos queratinócitos e demonstra que ocorreu estratificação nas culturas organotípicas. Na parte mais alta das culturas organotípicas, as escamas enucleadas descamam-se do topo da cultura. Até à data, não foram observadas diferenças histológicas na diferenciação ao nível de microscópio óptico entre os queratinócitos parentais e a linha celular de queratinócitos de NIKS cultivada em cultura organotípica.

Para observar características mais detalhadas das culturas organotípicas parentais (passagem 5) e NIKS (passagem 38) e para confirmar as observações histológicas, as amostras foram analisadas utilizando microscopia electrónica. As células parentais e a linha celular de queratinócitos humanos imortalizados, NIKS, foram recolhidas após 15 dias em cultura organotípica e seccionadas perpendiculares à camada basal, para mostrar a extensão de estratificação. As células parentais e a linha celular de NIKS sofrem extensa estratificação em cultura organotípica e formam estruturas que são características de epiderme humana normal. São formados desmossomas abundantes em culturas organotípicas de células parentais e da linha celular de NIKS. A formação de uma lâmina basal e hemidesmossomas associados nas camadas de queratinócitos basais das células parentais e da linha celular também foi notada. Os hemidesmossomas são estruturas especializadas que aumentam a adesão dos queratinócitos à lâmina basal e ajudam a manter a integridade e resistência do tecido. A presença destas

estruturas era especialmente evidente em áreas onde as células parentais ou as células NIKS se tinham conjugado directamente ao suporte poroso. Estas constatações são consistentes com constatações ultra-estruturais anteriores utilizando queratinócitos de prepúcio humano, cultivados num suporte poroso contendo fibroblastos. A análise aos níveis de microscopia óptica e electrónica demonstra que a linha celular de NIKS em cultura organotípica se pode estratificar, diferenciar e formar estruturas, tais como desmossomas, lâmina basal e hemidesmossomas, verificadas em epiderme humana normal.

B. Condições de Cultura para Criação de Função de Barreira Melhorada em Substitutos de Pele

Em algumas formas de realização do presente pedido, são proporcionados métodos de cultivo de equivalentes de pele que resultam em função de barreira melhorada, em comparação com equivalentes de pele cultivados por métodos convencionais. A estratificação e diferenciação histológica totais de queratinócitos normais podem ser alcançadas pela utilização de métodos de cultura organotípica tridimensionais (Bell *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76:1274-1278 (1979); Fusenig, Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation *in vitro*, em *The Keratinocyte Handbook*, I.M. Leigh, Lane, E.B., e F.M. Watt, Editor. 1994, University Press: Cambridge (1994); Parenteau *et al.*, *Cytotechnology*, 9: 163-171(1992)). Os queratinócitos normais cultivados na superfície de géis de colagénio contendo fibroblastos dérmicos podem gerar estruturas especializadas, tais como a membrana basal e hemidesmossomas, que são característicos da arquitectura de tecido normal de epitélios escamosos estratificados. A

técnica de cultura organotípica para queratinócitos normais acolheu o desenvolvimento recente de modelos *in vitro* para estudos farmacotoxicológicos cutâneos. Esta tornou-se numa alternativa importante aos testes animais.

Quando as culturas *in vitro* de queratinócitos humanos são cultivadas numa interface ar-líquido, um estrato córneo altamente ordenado é formado. Embora a permeabilidade à água diminua com o tempo de cultivo aumentado na interface ar-líquido (Cumpstone *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 92(4): 598-600 (1989)), a permeabilidade de culturas de equivalentes de pele *in vitro* é muito superior à de pele humana intacta, *i. e.*, nos sistemas de cultura, a função de barreira é defeituosa Ponc, *Int. J. Cosmetic Sci.*, 14: 245-264 (1992)). Num esforço para melhorar a barreira de permeabilidade, um número de variáveis de cultura foi examinado e alguns conduziram a propriedades melhoradas das culturas (Tabela 1). Por exemplo, o cultivo das culturas em humidade relativa diminuída melhora a função de barreira de culturas de equivalentes de pele (Mak *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 96(3): 323-7 (1991)). Considera-se que o fluxo de água transepidérmico pode servir como um sinal regulatório para a síntese e reparação lipídicas epidérmicas após disrupção da barreira epidérmica (Grubauer *et al.*, *J. Lipid Res.*, 30(3): 323-33 (1989)). Os murganhos sem pêlo também foram utilizados para demonstrar a função de barreira, morfologia epidérmica (espessura de SC, número de estruturas de membrana lamelares, número de corpos lamelares) e teor lipídico melhorados em resposta a humidade diminuída.

Uma diferença bioquímica chave entre substitutos de pele cultivados e pele intacta é o perfil de lípidos extracelulares que se verificam na camada mais externa da pele normal. As

culturas de queratinócitos diferenciados são deficientes em várias ceramidas que são constituintes fundamentais da pele normal (Ponec *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 109(3): 348-55 (1997)). Grandes quantidades destes lípidos extracelulares especializados são segregadas por queratinócitos diferenciados e dispostos em bicamadas lipídicas que são essenciais para a função de barreira epidérmica normal. A comparação da composição lipídica entre culturas de equivalentes de pele *in vitro* e pele humana revelou diferenças surpreendentes. A pele humana contém sete formas de ceramidas mas as culturas produziram, principalmente, as ceramidas 1-3 e muito pouco das ceramidas 6 e 7. O restabelecimento de um perfil lipídico mais completo tem sido o objectivo de vários estudos. Por exemplo, verificou-se que a adição de vitamina C aos meios era crítica para um espectro completo de lípidos de ceramida em culturas de equivalentes de pele. As ceramidas 6 e 7 contêm base esfingóide hidroxilada e/ou ácido gordo e a produção destes é provavelmente facilitada pela presença de vitamina C. Neste estudo, os perfis lipídicos das culturas de equivalentes de pele comercialmente disponíveis, EPIDERM, SKINETHIC e Equivalente de Pele Viva, eram todos deficientes nas ceramidas 5, 6 e 7. A adição de vitamina C melhorou o perfil lipídico e a arquitectura global de SC, como determinado por microscopia electrónica.

Tabela 1. Efeito de Substâncias adicionadas a Culturas *in vitro* na Função de Barreira ou Composição Lipídica

Composto	Função de Barreira	Composição Lipídica	Referência
EGF		Triglicéridos elevados	Ponec <i>et al.</i> , <i>supra</i> .
Estrogénio	Acelera		Williams <i>et al.</i> , <i>J Investig. Dermatol. Symp. Proc.</i> , 3(2): 75-9 (1998).
Activadores de FXAR	Acelera		Hanley <i>et al.</i> , <i>supra</i> .
Activadores de PPAR	Acelera		Hanley <i>et al.</i>
Vitamina C		Melhoramento fundamental	Ponec <i>et al.</i>
Vitamina E		Sem efeito	Ponec <i>et al.</i>
Vitamina D	Melhorada/Sem efeito		Williams <i>et al.</i> , Mac <i>et al.</i> , <i>supra</i> .

Os activadores de receptores hormonais nucleares foram testados para os seus efeitos no desenvolvimento da função de barreira. A adição de vitamina D conduziu a melhoramentos em alguns estudos (Mak *et al.*, *supra*) mas não em outros (Hanley *et al.*, *supra*). Os activadores do receptor activado por proliferador de peroxissoma (PPAR) e o receptor activado por farnesóide X (FXAR) aceleram a maturação de barreira em pele de rato fetal *in vitro* e *in utero*. As alterações estruturais eram

consistentes com a redução na perda de água transepidérmica, incluindo o surgimento de um SC distinto, um estrato granuloso espessado e densidade aumentada de estruturas lamelares.

A composição lipídica aberrante das culturas de equivalentes de pele também é melhorada pelo enxerto em murganhos imunodeficientes (Vicanova *et al.*, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 3(2): 114-20 (1998)). Quando enxertados em murganhos atímicos, os queratinócitos humanos cultivados retêm a capacidade de geração de uma epiderme diferenciada. Quando os substitutos de pele cultivados foram examinados, entre seis meses e dois anos após enxertia, foram observados melhoramentos significativos na composição lipídica e ultra-estrutura de SC. Os elevados níveis de triglicéridos e baixos níveis de ésteres de colesterol e ácidos gordos livres observados nas culturas *in vitro* foram normalizados aos seis meses após enxertia. As ceramidas 6 e 7, indetectáveis nas culturas *in vitro*, foram expressas pelas células humanas após seis meses de enxertia. Estes estudos realçam o facto de que as actuais condições de cultura *in vitro* são defeituosas na sua capacidade para produzirem equivalentes de pele com função de barreira normal. As condições de cultura melhoradas que mais estreitamente mimetizam os sinais de desenvolvimento normais devem melhorar o desenvolvimento da função de barreira.

O desenvolvimento da função de barreira *in vivo* é temporalmente regulado. No rato, por exemplo, no dia 19 gestacional, crias de rato fetal não têm barreira, mas no dia 21 uma barreira competente foi formada (Aszterbaum *et al.*, *Pediatr. Res.*, 31(4 Pt 1): 308-17 (1992)). O desenvolvimento de uma barreira epidérmica competente ocorre entre o dia 15 e 16 embrionário da gestação de murganho (Hardman *et al.*,

Development, 125: 1541-1552 (1998)). A barreira funcional surge coincidente com uma SC em multicamada e membranas lamelares maduras no SC. A expressão da proteína estrutural de corneócito loricrina, filagrina e involucrina, aumenta durante este período. A expressão de enzimas envolvidas no processamento lipídico, glucocerebrosidase beta e esteróide sulfatase, também aumenta. O processo também é susceptível de manipulação por factores ambientais e hormonais. Os activadores PPAR e FXAR, dados durante dois dias *in utero*, aceleraram o desenvolvimento da função de barreira em crias de dia 19, como medido por redução na perda de água transepidérmica. Os tratamentos também melhoraram a morfologia de SC e expressão génica de proteínas estruturais chave e funções enzimáticas.

Consequentemente, em algumas formas de realização do presente pedido, os seguintes tratamentos, isoladamente ou em combinação, são utilizados para proporcionar função de barreira aumentada em equivalentes de pele cultivados organotipicamente. Em algumas formas de realização, as culturas organotípicas são suplementadas com desde cerca de 1 micrograma/mL a cerca de 200 microgramas/mL de ácido ascórbico, de um modo preferido, cerca de 50 microgramas/mL de ácido ascórbico. Noutras formas de realização, as culturas organotípicas são suplementadas com cerca de 1 a 200 μ M de ácido linoleico, de um modo preferido, cerca de 30 μ M de ácido linoleico. Ainda em formas de realização adicionais, as culturas organotípicas são suplementadas com cerca de 1 a 200 μ M de farnesol, de um modo preferido, cerca de 50 μ M de farnesol. Ainda noutras formas de realização, as culturas organotípicas são realizadas a desde cerca de 50 a 95% de humidade, de um modo preferido, cerca de 75% de humidade. A função de barreira é convenientemente avaliada nos equivalentes de pele pela medição da capacitância eléctrica de superfície

(SEC). Em formas de realização preferidas, os equivalentes de pele com função de barreira melhorada, em comparação com equivalentes de pele de controlo, têm um valor de SEC de menos de cerca de 5 vezes da SEC observada em pele humana normal (e. g., cerca de 150-250 pF). Em formas de realização particularmente preferidas, os equivalentes de pele com função de barreira melhorada, em comparação com equivalentes de pele de controlo, têm uma SEC de menos de cerca de 2-3 vezes da SEC observada em pele humana normal (e. g., cerca de 80-120 pF). Noutras formas de realização, os equivalentes de pele com função de barreira melhorada são caracterizados por teor de ceramida. Consequentemente, em algumas formas de realização, o teor de ceramidas 5-7 é entre cerca de 20-50% da massa de ceramida total, de um modo preferido, cerca de 30-45% da massa de ceramida total. Noutras formas de realização, o teor de ceramida 2 está entre cerca de 10 e 40% da massa de ceramida total, de um modo preferido, cerca de 20 a 30% do teor de ceramida total.

O presente pedido proporciona, ainda, métodos e composições adicionais para produção de equivalentes de pele com características melhoradas, incluindo função de barreira melhorada. Os métodos e composições melhorados são descritos nas seguintes secções: 1) Técnicas de Cultura e 2) Meios de Cultura.

1. Técnicas de Cultura

O presente pedido proporciona técnicas de cultura organotípica melhorada para produção de equivalentes de pele com propriedades superiores. Em algumas formas de realização, um equivalente dérmico é preparado. Em formas de realização preferidas, o equivalente dérmico compreende colagénio e

fibroblastos humanos. A utilização de uma variedade de tipos de colagénio está contemplada, incluindo mas não limitada a colagénio de tendão de cauda de rato (Tipo I). Do mesmo modo, a utilização de uma variedade de diferentes tipos de fibroblastos está contemplada, incluindo mas não limitada a células NHDF (Fibroblastos Dérmicos Normais Humanos) e células recolhidas de um dador ou doente.

O presente pedido também não está limitado à utilização de qualquer concentração ou quantidade particular de colagénio. Em formas de realização preferidas, os equivalentes dérmicos são preparados com cerca de 0,2 mg de colagénio por centímetro quadrado do referido equivalente dérmico a 2,0 mg de colagénio por centímetro quadrado do referido equivalente dérmico. Em formas de realização mais preferidas, o equivalente dérmico contém cerca de 0,22 mg de colagénio por centímetro quadrado do referido equivalente dérmico a 1,0 mg de colagénio por centímetro quadrado do referido equivalente dérmico. Em formas de realização muito preferidas, o equivalente dérmico contém cerca de 0,5 mg de colagénio por centímetro quadrado do referido equivalente dérmico.

Em contraste com a maioria dos métodos descritos anteriormente para a cultura de pele organotípica, uma mistura de colagénio e fibroblastos é aplicada directamente a qualquer dispositivo de cultura sendo utilizado. A requerente verificou que a presença de uma primeira camada acelular não é necessária para se obter boa contracção e aderência ao dispositivo de cultura. Em algumas formas de realização, os fibroblastos são incluídos numa concentração final de cerca de 10000 células/mL a cerca de 100000 células/mL, de um modo preferido, cerca de 50000 células/mL.

Uma variedade de dispositivos de cultura encontra utilização no presente pedido. Os dispositivos de cultura preferidos (ver a Figura 4) são câmaras de crescimento constituídas por uma parede lateral e uma superfície inferior. Em algumas formas de realização preferidas, a câmara de crescimento é, em geral, em forma de taça. Em formas de realização preferidas, a superfície inferior é permeável ao meio de cultura. Um exemplo não limitativo de um material de superfície permeável adequado é polycarbonato poroso. O presente pedido é compatível com dispositivos de cultura comercialmente disponíveis, incluindo os insertos de cultura MILLICELL (MILLIPORE) e TRANSWELL (CORNING). Os insertos MILLICELL são especialmente úteis para a preparação de equivalentes de pele utilizados para efeitos de testagem (e. g., equivalentes de pele de cerca de 1 cm em diâmetro). A requerente verificou que uma pluralidade de insertos do tamanho do MILLICELL pode ser incubada numa placa de Petri maior (i. e., uma placa de cultura de 100 mm). Os insertos TRANSWELL são úteis para a produção de equivalentes de pele maiores (e. g., cerca de 10 cm em diâmetro). Estes equivalentes de pele maiores podem ser utilizados como enxertos, para testagem em grande escala, ou dissecados em formatos de testagem mais pequenos.

Em formas de realização preferidas, os equivalentes dérmicos vazados de fresco são submersos em meios de cultura e cultivados até que ocorra contracção do equivalente dérmico. Isto cria um equivalente dérmico com uma aparência, em geral, côncava. Nos métodos descritos anteriormente, após contracção da camada dérmica, a camada dérmica é semeada com queratinócitos e, depois, re-submersa. A cultura organotípica é, depois, levantada à interface de ar do meio de cultura após cerca de 4-7 dias. Em

contraste com estes métodos descritos anteriormente, a presente requerente verificou que é preferido levantar o equivalente dérmico à interface de ar antes da sementeira com queratinócitos. A cultura é, depois, de um modo preferido, mantida na interface de ar, à medida que a estratificação ocorre. Consequentemente, em algumas formas de realização, o equivalente dérmico é, de um modo preferido, levantado à interface de ar e mantido durante mais de cerca de 6 horas antes da sementeira. Em formas de realização mais preferidas, o equivalente dérmico é, de um modo preferido, levantado à interface de ar e mantido durante mais de cerca de doze horas antes da sementeira. Em formas de realização muito preferidas, o equivalente dérmico é, de um modo preferido, levantado à interface de ar e mantido durante mais de cerca de vinte e quatro horas antes da sementeira. Em algumas formas de realização, o equivalente dérmico é mantido durante mais de 24 horas na interface de ar, para proporcionar um equivalente dérmico pré-preparado para utilização posterior.

As técnicas de cultura do presente pedido proporcionam equivalentes de pele com propriedades superiores. Em formas de realização preferidas, os equivalentes de pele têm função de barreira melhorada, em comparação com equivalentes de pele descritos anteriormente. Ainda em formas de realização preferidas adicionais, o presente pedido proporciona equivalentes dérmicos para utilização na produção de equivalentes de pele com propriedades superiores. Em algumas formas de realização, os equivalentes dérmicos são caracterizados por conterem concentrações aumentadas de colagénio, como descrito acima.

Ainda em formas de realização preferidas adicionais, a presente invenção proporciona composições para utilização na produção de equivalentes de pele. Em algumas formas de realização, as composições compreendem a câmara de crescimento tendo uma superfície inferior e uma parede lateral. Em formas de realização adicionais, a câmara de crescimento inclui um equivalente dérmico adjacente à superfície inferior. Ainda em formas de realização adicionais, o equivalente dérmico está substancialmente aderido à parede lateral.

A requerente também verificou que a densidade de sementeira dos queratinócitos nos equivalentes dérmicos pode afectar a qualidade do equivalente de pele resultante. Consequentemente, em algumas formas de realização do presente pedido, a densidade de sementeira é aumentada em, aproximadamente, uma ordem de grandeza em relação aos métodos descritos anteriormente. Em algumas formas de realização, a densidade de sementeira de queratinócitos varia entre cerca de 1×10^5 e 1×10^6 células/cm² de equivalente dérmico. Ainda em formas de realização preferidas adicionais, a densidade de sementeira de queratinócitos é cerca de $4,65 \times 10^5$ células/cm² de equivalente dérmico.

A função de barreira é convenientemente avaliada nos equivalentes de pele pela medição da capacitância eléctrica de superfície (SEC). Em formas de realização preferidas, os equivalentes de pele com função de barreira melhorada, em comparação com equivalentes de pele de controlo, têm um valor de SEC de menos de cerca de 5 vezes da SEC observada em pele humana normal (e. g., cerca de 150-250 pF). Em formas de realização particularmente preferidas, os equivalentes de pele com função de barreira melhorada, em comparação com equivalentes de pele de controlo, têm uma SEC de menos de cerca de 2-3 vezes da SEC

observada em pele humana normal (e. g., cerca de 80-120 pF). Noutras formas de realização, os equivalentes de pele com função de barreira melhorada são caracterizados por teor de ceramida. Consequentemente, em algumas formas de realização, o teor de ceramidas 5-7 está entre cerca de 20-50% da massa de ceramida total, de um modo preferido, cerca de 30-45% da massa de ceramida total. Noutras formas de realização, o teor de ceramida 2 está entre cerca de 10 e 40% da massa de ceramida total, de um modo preferido, cerca de 20 a 30% do teor de ceramida total.

2. Meios de Cultura

O presente pedido proporciona meios de cultura organotípica melhorada para produção de equivalentes de pele com propriedades superiores. Em algumas formas de realização, os meios de cultura do presente pedido são o meio F12 de Ham e o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Em algumas formas de realização, o F12 de Ham e DMEM são suplementados com, pelo menos, um dos seguintes suplementos: albumina de soro bovino, isoproterenol, carnitina, serina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, α -tocoferol, ácido ascórbico e factor de crescimento epidérmico (EGF). Noutras formas de realização, pelo menos um, de albumina de soro bovino, isoproterenol, carnitina, serina, ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, α -tocoferol, ácido ascórbico e EGF é(são) proporcionado(s) em concentração(ões) suficiente(s) para melhorar a função de barreira em equivalentes de pele cultivados *in vitro*. Ainda noutras formas de realização, o meio compreende um suplemento de soro, de um modo preferido, Clone II Fetal. Em algumas formas de realização, o meio compreende, ainda, pelo menos, um dos

seguintes suplementos: hidrocortisona, toxina da cólera, insulina, adenina e CaCl_2 . Em formas de realização preferidas, a albumina de soro bovino é proporcionada a uma concentração de cerca de 0,1 mg/mL a 20 mg/mL, de um modo preferido, cerca de 1 mg/mL, o isoproterenol é proporcionado a uma concentração de cerca de 0,1-10,0 μM , a carnitina é proporcionada a uma concentração de cerca de 1,0-100,0 μM , a serina é proporcionada a uma concentração de cerca de 1,0-100,0 μM , o ácido oleico é proporcionado a uma concentração de cerca de 1,0-100,0 μM , o ácido linoleico é proporcionado a uma concentração de cerca de 1,0-100,0 μM , o ácido araquidónico é proporcionado a uma concentração de cerca de 1,0-100,0 μM , o α -tocoferol é proporcionado a uma concentração de cerca de 0,1-10,0 μM , o ácido ascórbico é proporcionado a uma concentração de cerca de 0,005-5,0 mg/mL e o factor de crescimento epidérmico é proporcionado a uma concentração de cerca de 0,1-10,0 ng/mL.

C. Modificação Genética de Células para Função de Barreira Melhorada

O presente pedido também contempla que a função de barreira pode ser melhorada pela expressão de GKLF heterólogo nas células descrita na Secção A. A expressão de GKLF heterólogo também pode ser combinada com as condições de cultura melhoradas descritas na Secção B. As fases finais da diferenciação epidérmica são precedidas por expressão aumentada de numerosos genes que codificam as enzimas requeridas para as modificações bioquímicas que resultam no estrato córneo. Além disso, as condições de cultura que estimulam a diferenciação de queratinócitos ou disrupção experimental da função de barreira de pele resultam em expressão aumentada de enzimas envolvidas na síntese lipídica

extracelular e metabolismo. Estas alterações em expressão génica indicam que um ou mais factores de transcrição regulatórios são responsáveis pela alteração do perfil de expressão génica de queratinócitos em diferenciação, para facilitar o desenvolvimento da barreira epidérmica. O momento preciso da função de barreira da pele no desenvolvimento sugere um controlo temporal preciso por um interruptor do desenvolvimento. Complexos programas do desenvolvimento podem ser iniciados pela acção de um ou um pequeno número de factores de transcrição regulatórios chave, por vezes denominados reguladores principais ou genes selectores. Um estudo recente sobre uma mutação knock-out no factor de transcrição, factor 4 semelhante a Kruppel (Klf4), pode ter identificado um dos reguladores chave da função de barreira na pele (Segre et al., *Nat. Genet.*, 22(4): 356-60 (1999)).

Os murganhos mutantes Klf4 nascem em número normal mas morrem pouco (<15 h) após o nascimento, aparentemente de choque hipovolémico, como resultado de perda excessiva de fluido evaporativo. Análise adicional demonstrou que, enquanto os murganhos normais desenvolvem uma função de barreira epidérmica intacta no dia 17,5 de gestação, os murganhos mutantes Klf4 não desenvolvem esta função de barreira e têm uma epiderme que exhibe excessiva perda de água transepidérmica. O Klf4 é expresso nas camadas em diferenciação da epiderme, as camadas espinosa e granular superiores. Em contraste com os defeitos causados em outras linhas de murganhos mutantes, a ausência de Klf4 não resulta em alterações grosseiras da ultra-estrutura epidérmica ou em perfis lipídicos. Isto conduziu à hipótese de que o seu papel primário é na aquisição da função de barreira. Consistente com isto, foram observados defeitos no estrato granuloso nos grânulos querato-hialinos e achatamento de células de SC. Em EM,

as lamelas intercelulares eram descontínuas na pele mutante. O defeito na pele mutante de Klf-4 não foi resgatado pelo seu enxerto nos murganhos de criação. O Klf4 é um membro de uma família de factores de transcrição; outros membros estão implicados em eventos de diferenciação específica de tecido em células eritróides e células T. A análise de diferenças de expressão génica entre murganhos de tipo selvagem e mutantes de Klf4 conduziu à identificação de três genes que estavam regulados positivamente na pele de mutante, sugerindo que o Klf4 pode reprimir normalmente a expressão destes genes. A observação de que a perda de Klf4 não tem outros efeitos observáveis no desenvolvimento de murganho sugere que o Klf4 funciona, principalmente, para regular o desenvolvimento da barreira de permeabilidade epidérmica. O papel de Klf4 na aquisição da função de barreira epidérmica levanta a possibilidade de que a expressão de Klf4 em substitutos de pele cultivados poderá melhorar as propriedades de barreira destas culturas de pele sintéticas.

Consequentemente, em algumas formas de realização, queratinócitos primários ou queratinócitos imortalizados são transfectados com um vector codificando um homólogo de GKLF funcional. Está contemplado que, quando estes queratinócitos são cultivados organotipicamente, o equivalente de pele resultante exibirá função de barreira melhorada, em comparação com culturas organotípicas formadas a partir de queratinócitos de controlo, não transfectados. Em formas de realização preferidas, os equivalentes de pele com função de barreira melhorada, em comparação com equivalentes de pele de controlo, têm um valor de SEC de menos de cerca de 5 vezes da SEC observada em pele humana normal (e. g., cerca de 150-250 pF). Em formas de realização particularmente preferidas, os equivalentes de pele com função

de barreira melhorada, em comparação com equivalentes de pele de controlo, têm uma SEC de menos de cerca de 2-3 vezes da SEC observada em pele humana normal (e. g., cerca de 80-120 pF). Noutras formas de realização, os equivalentes de pele com função de barreira melhorada são caracterizados por teor de ceramida. Consequentemente, em algumas formas de realização, o teor de ceramidas 5-7 está entre cerca de 20-50% da massa de ceramida total, de um modo preferido, cerca de 30-45% da massa de ceramida total. Noutras formas de realização, o teor de ceramida 2 está entre cerca de 10 e 40% da massa de ceramida total, de um modo preferido, cerca de 20 a 30% do teor de ceramida total.

O presente pedido não está limitado à utilização de qualquer homólogo ou variante de GKLF particular. De facto, uma variedade de variantes de GKLF pode ser utilizada, desde que retenha, pelo menos, alguma da actividade de GKLF de tipo selvagem. Em particular, está contemplado que o GKLF de murganho (SEQ ID N°: 1) e humano (SEQ ID N°: 2) encontra utilização no presente pedido. Além disso, está contemplado que os variantes de GKLF codificados por sequências que se hibridam às SEQ ID N°: 1 e 2, sob condições de estringência baixa a elevada, encontrarão utilização no presente pedido. Os variantes funcionais podem ser rastreados por expressão do variante num vector apropriado (descrito em maior detalhe abaixo) em queratinócitos, utilizando os queratinócitos para produzir um equivalente de pele e analisando o equivalente de pele para função de barreira aumentada. Alternativamente, os variantes funcionais podem ser identificados por um ensaio de desvio de mobilidade electroforética, como descrito em (Zhang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273(28): 17917-25 (1998)).

Em algumas formas de realização, os variantes resultam de mutação, (*i. e.*, uma alteração na sequência de ácidos nucleicos) e, em geral, produzem ARNm ou polipéptidos alterados, cuja estrutura ou função pode ou não ser alterada. Qualquer gene dado pode ter nenhuma, uma ou muitas formas variantes. As alterações mutacionais comuns que dão origem a variantes são, em geral, atribuídas a deleções, adições ou substituições de ácidos nucleicos. Cada destes tipos de alterações pode ocorrer isoladamente ou em combinação com as outras e à taxa de uma ou mais vezes numa dada sequência.

Está contemplado que é possível modificar a estrutura de um péptido tendo uma função (*e. g.*, função de GKLF) para efeitos, tais como aumento da afinidade de ligação de GKLF pelo seu ligando de ácido nucleico. Esses péptidos modificados são considerados equivalentes funcionais de péptidos tendo uma actividade de GKLF, como aqui definido. Pode ser produzido um péptido modificado, no qual a sequência nucleotídica codificando o polipéptido foi alterada, tal como por substituição, deleção ou adição. Em formas de realização particularmente preferidas, estas modificações não reduzem significativamente a actividade do GKLF modificado. Por outras palavras, a construção "X" pode ser avaliada de modo a determinar se é um membro do género do GKLF modificado ou variante do presente pedido, como definido funcionalmente, em vez de estruturalmente. Em formas de realização preferidas, a actividade de GKLF variante ou mutante é avaliada pelos métodos descritos acima.

Além disso, como descrito acima, as formas variantes de GKLF também estão contempladas como sendo equivalentes aos péptidos e moléculas de ADN que são aqui expostos em maior detalhe. Por exemplo, está contemplado que a substituição

isolada de uma leucina com uma isoleucina ou valina, um aspartato com um glutamato, uma treonina com uma serina ou uma substituição semelhante de um aminoácido com um aminoácido estruturalmente relacionado (*i. e.*, mutações conservativas) não terá um efeito principal na actividade biológica da molécula resultante. Consequentemente, algumas formas de realização do presente pedido proporcionam variantes de GKLF aqui divulgado contendo substituições conservativas. As substituições Conservativas são as que acontecem numa família de aminoácidos que são relacionados nas suas cadeias laterais. Os aminoácidos geneticamente codificados podem ser divididos em quatro famílias: (1) acídica (aspartato, glutamato); (2) básica (lisina, arginina, histidina); (3) não polar (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano); e (4) polar não carregada (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). A fenilalanina, triptofano e tirosina são, por vezes, classificados conjuntamente como aminoácidos aromáticos. De modo semelhante, o repertório de aminoácido pode ser agrupado como (1) ácido (aspartato, glutamato); (2) básico (lisina, arginina, histidina), (3) alifático (glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, serina, treonina), com serina e treonina opcionalmente agrupadas separadamente como alifático-hidroxilo; (4) aromático (fenilalanina, tirosina, triptofano); (5) amida (asparagina, glutamina); e (6) contendo enxofre (cisteína e metionina) (*e. g.*, Stryer ed., *Biochemistry*, p. 17-21, 2ª ed, WH Freeman and Co., 1981). Se uma alteração na sequência de aminoácidos de um péptido resulta num homólogo funcional pode ser facilmente determinado pela avaliação da capacidade de o péptido variante funcionar num modo semelhante à proteína de tipo selvagem. Os péptidos tendo mais de uma substituição podem ser facilmente testados da mesma forma.

Mais raramente, um variante inclui alterações “não conservativas” (e. g., substituição de uma glicina com um triptofano). Variações menores análogas também podem incluir deleções ou inserções de aminoácido, ou ambas. Orientação na determinação de que resíduos de aminoácido podem ser substituídos, inseridos ou delecionados, sem abolir a actividade biológica, pode consultar-se utilizando programas de computador (e. g., software LASERGENE, DNASTAR Inc., Madison, Wis.).

O GKLF heterólogo é expresso em queratinócitos pela utilização de um vector e sequências regulatórias adequados. Em algumas formas de realização preferidas, são utilizados promotores de involucrina ou transglutaminase 3. Em outras formas de realização preferidas, a expressão de GKLF será dirigida pelo sistema de promotor indutível do plasmídeo pTetOn (Clontech, Palo Alto, CA). Está contemplado que vários outros vectores de expressão mamíferos são adequados para utilização no presente pedido, incluindo mas não limitado a pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, PXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Qualquer outro plasmídeo ou vector pode ser utilizado, desde que sejam replicáveis e viáveis no hospedeiro. Em algumas formas de realização preferidas do presente pedido, os vectores de expressão mamíferos compreendem uma origem de replicação, um promotor e estimulador adequados e também quaisquer sítios de ligação de ribossoma necessários, sítios de poliadenilação, sítios dadores e aceitadores de excisão, sequências de terminação de transcrição e sequências não transcritas flanqueantes em 5'. Noutras formas de realização, as sequências de ADN derivadas da excisão de SV40 e sítios de poliadenilação podem ser utilizados para proporcionar os elementos genéticos não transcritos requeridos. Além disso, o

gene de Klf4 pode ser inserido por meio de um vector retroviral. Em formas de realização particularmente preferidas, o vector retroviral é o vector retroviral pseudotipado (Clontech, Palo Alto, CA). A transfecção pode ser alcançada por qualquer método conhecido na técnica, incluindo mas não limitado a co-precipitação por fosfato de cálcio, electroporação, bombardeamento de micropartículas, transfecção mediada por lipossomas ou infecção retroviral.

D. Utilizações de Substitutos de Pele tendo Função de Barreira Melhorada

Está contemplado que os substitutos de pele da presente invenção têm uma variedade de utilizações. Estas utilizações incluem mas não estão limitadas a utilização para compostos de rastreio (e. g., irritantes), substratos para cultivo de tumores e agentes patológicos (e. g., vírus do papiloma humano) e utilização para oclusão de feridas e tratamento de queimaduras. Estas utilizações são descritas em maior detalhe abaixo.

1. Utilização para compostos de Rastreio

Os equivalentes de pele da presente invenção podem ser utilizados para uma variedade de testes *in vitro*. Em particular, os equivalentes de pele encontram utilização na avaliação de: produtos de cuidado da pele, metabolismo de fármacos, respostas celulares a compostos de teste, cicatrização de feridas, fototoxicidade, irritação dérmica, inflamação dérmica, corrosividade de pele e lesão celular. Os equivalentes de pele são proporcionados numa variedade de formatos para testagem,

incluindo mas não limitados a placas de 6 poços, 24 poços e 96 poços. Além disso, os equivalentes de pele podem ser divididos por técnicas de dissecação correntes e, depois, testados. Os equivalentes de pele da presente invenção têm uma camada epidérmica com um estrato córneo diferenciado e camada dérmica que inclui fibroblastos dérmicos. Como descrito acima, em formas de realização particularmente preferidas, a camada epidérmica é derivada de células NIKS imortalizadas. Outras linhas celulares preferidas, incluindo células NIKS, são caracterizadas por i) serem imortalizadas; ii) serem não tumorigénicas; iii) formarem envelopes cornificado quando induzidas a se diferenciarem; iv) sofrerem diferenciação escamosa normal em cultura organotípica; e v) manterem requisitos de crescimento específicos de tipo de célula em cultura submersa, em que os referidos requisitos de crescimento específicos de tipo de célula incluem 1) exibição de características morfológicas de queratinócitos humanos normais quando cultivados em meio de crescimento de queratinócitos padrão na presença de células alimentadoras 3T3 tratadas com mitomicina C; 2) dependência do factor de crescimento epidérmico para cultura serial; e 3) inibição do crescimento pelo factor β 1 de crescimento transformante.

O presente pedido abrange uma variedade de ensaios de rastreio. Em algumas formas de realização, o método de rastreio compreende proporcionar um equivalente de pele da presente invenção e, pelo menos, um composto ou produto de teste (e. g., um produto de cuidado da pele, tais como um creme hidratante, cosmético, corante ou fragrância; os produtos podem estar em qualquer forma, incluindo mas não limitada a cremes, loções, líquidos e sprays), aplicação do produto ou composto de teste a equivalente de pele e ensaio do efeito do produto ou composto de teste no equivalente de pele. Uma ampla variedade de ensaios é

utilizada para determinar o efeito do produto ou composto de teste no equivalente de pele. Estes ensaios incluem mas não estão limitados a ensaios de citotoxicidade de MTT (Gay, *The Living Skin Equivalent as an In Vitro Model for Ranking the Toxic Potential of Dermal Irritants, Toxic. In Vitro* (1992)) e ELISA para ensaiar a libertação de moduladores inflamatórios (e. g., prostaglandina E2, prostaciclina e interleucina-1-alfa) e quimioatractores. Os ensaios podem ser ainda dirigidos à toxicidade, potência ou eficácia do composto ou produto. Além disso, pode ser testado o efeito do composto ou produto no crescimento, função de barreira ou resistência tecidular.

Em particular, o presente pedido contempla a utilização dos equivalentes de pele para rastreio de alta capacidade de compostos a partir de bibliotecas combinatórias (e. g., bibliotecas contendo mais de 10^4 compostos). Em algumas formas de realização, as células são utilizadas em ensaios de segundo mensageiro que monitorizam a transdução de sinal após activação de receptores de superfície celular. Noutras formas de realização, as células podem ser utilizadas em ensaios de gene repórter que monitorizam respostas celulares ao nível de transcrição/tradução. Ainda em formas de realização adicionais, as células podem ser utilizadas em ensaios de proliferação celular para monitorizar a resposta de crescimento/sem crescimento global das células a estímulos externos.

Em ensaios de segundo mensageiro, os equivalentes de pele são tratados com um composto ou pluralidade de compostos (e. g., de uma biblioteca combinatória) e ensaiados para a presença ou ausência de uma resposta de segundo mensageiro. Em algumas formas de realização preferidas, as células, i. e., (células NIKS) utilizadas para criar os equivalentes de pele são

transfectadas com um vector de expressão codificando um receptor de superfície de célula recombinante, canal iónico, canal dependente de voltagem ou qualquer outra proteína de interesse envolvida numa cascata de sinalização. Está contemplado que, pelo menos, alguns dos compostos na biblioteca combinatória podem servir como agonistas, antagonistas, activadores ou inibidores da proteína ou proteínas codificadas pelos vectores. Também está contemplado que, pelo menos, alguns dos compostos na biblioteca combinatória podem servir como agonistas, antagonistas, activadores ou inibidores da proteína actuando a montante ou jusante da proteína codificada pelo vector numa via de transdução de sinal.

Em algumas formas de realização, os ensaios de segundo mensageiro medem sinais fluorescentes de moléculas repórter que respondem a alterações intracelulares (e. g., concentração de Ca^{2+} , potencial de membrana, pH, IP3, cAMP, libertação de ácido araquidónico), devido a estimulação dos receptores de membrana e canais iónicos (e. g., canais iónicos dependentes de ligando) (Denyer *et al.*, *Drug Discov. Today* 3:323-32 (1998); Gonzales *et al.*, *Drug. Discov. Today* 4:431-39 (1999)). Os exemplos de moléculas repórter incluem mas não estão limitados a sistemas de transferência de energia de ressonância de fluorescência (e. g., Cuo-lípidos e oxonóis, EDAN/DABCYL), indicadores sensíveis a cálcio (e. g., Fluo-3, FURA 2, INDO 1 e FLUO3/AM, BAPTA AM), indicadores sensíveis a cloreto (e. g., SPQ, SPA), indicadores sensíveis a potássio (e. g., PBFI), indicadores sensíveis a sódio (e. g., SBFI) e indicadores sensíveis a pH (e. g., BCECF).

Em geral, as células compreendendo os equivalentes de pele são carregados com o indicador antes da exposição ao composto. As respostas das células hospedeiras a tratamento com os

compostos podem ser detectadas por métodos conhecidos na técnica, incluindo mas não limitados a microscopia de fluorescência, microscopia confocal, citometria de fluxo, dispositivos microfluídicos, sistemas de FLIPR (Schroeder e Neagle, *J. Biomol. Screening* 1:75-80 (1996)) e sistemas de leitura de placas. Em algumas formas de realização preferidas, a resposta (e. g., aumento na intensidade fluorescente) causada por composto de actividade desconhecida é comparada com a resposta gerada por um agonista conhecido e expressa como uma percentagem da resposta máxima do agonista conhecido. A resposta máxima causada por um agonista conhecido é definida como uma resposta de 100%. Do mesmo modo, a resposta máxima registada após adição de um agonista a uma amostra contendo um antagonista conhecido ou de teste é de um modo detectável inferior à resposta de 100%.

Os equivalentes de pele da presente invenção também são úteis em ensaios de gene repórter. Os ensaios de gene repórter envolvem a utilização de células hospedeiras transfectadas com vectores codificando um ácido nucleico compreendendo elementos de controlo transcricional de um gene alvo (*i. e.*, um gene que controla a expressão e função biológicas de um alvo de doença ou resposta inflamatória) excisado numa sequência codificante para um gene repórter. Por conseguinte, a activação do gene alvo resulta na activação do produto de gene repórter. Isto serve como indicador da resposta a essa resposta inflamatória. Por conseguinte, em algumas formas de realização, a construção de gene repórter compreende a região regulatória 5' (e. g., promotores e/ou estimuladores) de um gene que é induzido devido a inflamação ou irritação de pele ou proteína que está envolvida na síntese de compostos produzidos em resposta a inflamação ou irritação (e. g., prostaglandina ou prostaciclina) ligados de

modo operativo a um gene repórter. Os exemplos de genes repórter encontrando utilização na presente invenção incluem mas não estão limitados a cloranfenicol transferase, fosfatase alcalina, luciferases de pirilampo e bacterianas, β -galactosidase, β -lactamase e proteína verde fluorescente. A produção destas proteínas, com a excepção de proteína verde, vermelha, amarela ou azul fluorescente, é detectada através da utilização de produtos quimioluminescentes, colorimétricos ou bioluminescentes de substratos específicos (e. g., X-gal e luciferina). As comparações entre compostos de actividades conhecidas e desconhecidas podem ser conduzidas como descrito acima.

Em outras formas de realização preferidas, o equivalente de pele encontra utilização para o rastreio de eficácia de introdução de fármacos na pele ou o efeito de fármacos dirigidos à pele. Nestas formas de realização, os equivalentes de pele são tratados com o sistema de distribuição de fármacos ou fármaco e a permeação, penetração ou retenção do fármaco no equivalente de pele é ensaiada. Os métodos para o ensaio de permeação de fármaco são proporcionados em Asbill *et al.*, *Pharm Res.* 17(9): 1092-97 (2000). Em algumas formas de realização, os equivalentes de pele são montados por cima de células de difusão de Franz modificada. Os equivalentes de pele são deixados hidratar durante uma hora e, depois, pré-tratados durante uma hora com propilenoglicol. Uma suspensão saturada do fármaco modelo em propilenoglicol é, depois, adicionada ao equivalente de pele. O equivalente de pele pode ser, depois, amostrado a intervalos predeterminados. Os equivalentes de pele são, depois, analisados por HPLC para determinar a concentração do fármaco na amostra. Os valores de Log P para os fármacos podem ser determinados utilizando o programa ACD (Advanced Chemistry Inc., Ontário, Canadá). Estes métodos podem ser adaptados para estudar a

distribuição de fármacos por meio de adesivos transdérmicos ou outros modos de distribuição.

Ainda em formas de realização preferidas adicionais, os equivalentes dérmicos semeados, que ainda não tenham sofrido diferenciação, encontram utilização em ensaios para compostos que inibem, aceleram ou, de outro modo, efectuam a diferenciação dos queratinócitos semeados.

2. Testagem de Irritação de Pele

Em algumas formas de realização, os equivalentes de pele da presente invenção são utilizados em ensaios de gene repórter para a testagem de compostos para a sua actividade irritante de pele. Noutras formas de realização, o presente pedido proporciona métodos de utilização do equivalente de pele para a identificação de novos genes que são responsivos e irritantes de pele conhecidos. Os novos genes identificados utilizando os métodos do presente pedido encontram, ainda, utilização na geração de construções de gene repórter adicionais para rastreio de potenciais irritantes de pele.

Foram efectuadas experiências iniciais de rastreio para confirmar que transfectantes estáveis de queratinócitos de NIKS expressando um transgene (GFP) exibem estratificação normal em cultura organotípica. As células NIKS foram transfectadas de um modo estável com a proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria* e uma população clonal foi isolada. A capacidade de estas células NIKS positivas para GFP (NIKS^{GFP}) transfectadas de um modo estável recriarem a arquitectura de tecido normal em culturas organotípicas foi testada. As amostras foram

congeladas, seccionadas em crióstato e analisadas por microscopia fluorescente. As culturas foram, em primeiro lugar, examinadas para expressão e localização de GFP. Além disso, as secções foram coradas com Hoechst, um corante nuclear, e hematoxilina e eosina (H&E) para orientar e visualizar as camadas celulares das culturas. As secções de culturas organotípicas foram visualizadas utilizando um microscópio fluorescente invertido IX-70 (Olympus), equipado com filtros de GFP e Hoechst (Ampliação, 400X). As secções de culturas de NIKS^{GFP} mostraram que a GFP estava presente em todas as camadas da cultura organotípica, com a fluorescência mais intensa observada na camada cornificada.

A histologia das culturas de NIKS^{GFP} organotípicas foi depois comparada com a das células NIKS não transfectadas e queratinócitos de BC-1-Ep parentais. As secções coradas com H&E de massas de NIKS^{GFP} mostraram uma camada basal definida, bem organizada e excelente estratificação, sem anormalidades relativamente a controlos não transfectados e a queratinócitos de BC-1-Ep parentais. Todas as três culturas mostram estratificação celular comparável, sem diferenças histológicas visíveis ao nível de microscópio óptico.

Para examinar ainda a capacidade de as células NIKS^{GFP} se diferenciarem normalmente, a expressão de vários marcadores de diferenciação específicos de queratinócito foi analisada por microscopia de imunofluorescência. À medida que os queratinócitos se deslocam para uma posição suprabasal no tecido, sintetizam proteínas específicas de diferenciação. Os queratinócitos cessam a produção das queratinas K5 e K14 basais e começam a expressar as queratinas K1 e K10 específicas de diferenciação, que são expressas por todas as restantes camadas

na epiderme. As secções das culturas organotípicas foram examinadas para expressão e localização de K10, utilizando imunofluorescência indirecta. A queratina 10 era expressa normalmente nas camadas suprabasais em culturas organotípicas de BC-1-Ep, NIKS e NIKS^{GFP}. Para caracterizar ainda o padrão de diferenciação das células NIKS^{GFP}, a expressão e localização de filagrina, que é um marcador de diferenciação de fase tardia, foram examinadas. A diferenciação de queratinócitos no estrato granuloso é distinguida pela presença de grânulos de queratohialina distintos. Estes grânulos são compostos por filagrina e outras proteínas que são precursores para a produção do envelope cornificado. A coloração de filagrina em secções de todas as culturas organotípicas exibiu um padrão pontilhado, característico de células na camada granular.

Além disso, a expressão e localização dos componentes de junção aderentes, caderina E e P, foram analisadas. Na epiderme normal, dois membros da família clássica de caderina, caderina E e P, são expressos, desempenhando ambos um papel importante na diferenciação e adesão celular na epiderme. A expressão de caderina P está limitada à camada basal e a caderina E está localizada por toda a epiderme. O padrão de coloração de caderina E está normal e localizado nas margens célula-célula em secções de todas as três culturas. Estes dados demonstram que as células NIKS geneticamente modificadas exibem diferenciação normal. Deste modo, está contemplado que as células NIKS contendo construções de gene repórter formarão equivalentes de pele cultivados semelhantes aos formados com queratinócitos primários.

Também foram realizadas experiências para confirmar que, em resposta a irritantes conhecidos, as células NIKS segregam uma

citocina conhecida por ser segregada em resposta a irritantes de pele. O Exemplo 3 demonstrou que as células NIKS segregam IL-1 α em resposta a um irritante de pele conhecido.

i) Ensaios de Gene Repórter

Em algumas formas de realização, a presente invenção proporciona células equivalentes de pele (*i. e.,* NIKS) compreendendo uma construção de gene repórter responsiva a irritantes de pele. As construções de gene repórter adequadas incluem mas não estão limitadas às descritas acima. Em algumas formas de realização, as células têm ainda função de barreira melhorada.

Estudos anteriores indicaram que a expressão de IL-8 se correlaciona bem com irritação de pele (de Brugerolle de Fraissinette *et al., Cell Biology e Toxicology*, 15:121 [1999]). As sequências publicadas do gene de IL-8 incluem 1482 pb de ADN a montante do sítio de iniciação de transcrição e 102 pb de ADN transcrito, não traduzido, a montante da região codificante de IL-8 (Mukaida *et al., J. Immunology*, 143:1366 [1989]). Chang e colaboradores verificaram que um gene repórter contendo sequências promotoras de IL-8 entre -1472 e +19 é induzido por ácido trans-retinóico em células epiteliais traqueobrônquicas (Chang *et al., Am J. Respir Cell Mol Biol.* 22:502 [2000]). Abe *et al.*, mostraram que fragmentos de promotor de IL-8 contendo tanto quanto 130 pb a montante do sítio de iniciação de transcrição dirigem a expressão indutível de um gene repórter de luciferase (Abe *et al., Am J. Respir Cell Mol Biol.*, 22:51 [2000]). Este fragmento contém sítios de ligação para NF- κ B, AP-1 e NF-IL-6 e os sítios de ligação para estes factores são

requeridos para expressão indutível de IL-8 (revisto em Roebuck, *J. Interferon Cytokine Res.*, 19:429 [1999]).

Consequentemente, em algumas formas de realização, a presente invenção proporciona células de equivalente de pele (*i. e.*, NIKS) compreendendo um gene repórter em que a expressão de um gene repórter (*e. g.*, uma enzima) é controlada pela região regulatória de um gene responsivo e irritante. A presente invenção não está limitada a qualquer promotor responsivo e irritante. De facto, uma variedade de promotores está contemplada, incluindo mas não limitada a IL-8 e IL-1 α . A presente invenção não está limitada à região regulatória integral do gene responsivo e irritante. De facto, em algumas formas de realização, fragmentos compreendendo uma porção da região regulatória estão contemplados. Qualquer região ou regiões que sejam responsivas a um irritante encontram utilização na presente invenção. Orientação para determinar se uma dada região de um gene é responsiva é proporcionada no Exemplo 4 abaixo.

A presente invenção não está limitada a qualquer gene repórter particular. De facto, uma variedade de genes repórter está contemplada, incluindo mas não limitada a fosfatase alcalina segregada (SEAP), cloranfenicol transferase, luciferases de pirilampo e bacterianas, -galactosidase, -lactamase e proteína verde fluorescente. A produção destas proteínas, com a excepção de proteína verde fluorescente, é detectada através da utilização de produtos quimioluminescentes, colorimétricos ou bioluminescentes de substratos específicos (*e. g.*, X-gal e luciferina).

As construções de gene repórter contidas num plasmídeo são geradas utilizando técnicas correntes de biologia molecular. Por exemplo, em algumas formas de realização, o pSEAP (Tropix, Bedford, MA) é utilizado para gerar uma construção de gene repórter. O pSEAP é um vector de expressão mamífero desprovido de um promotor e contendo o gene de SEAP (Berger *et al.*, 1988). O vector contém um poliadaptador para inserção de promotor/estimulador, assim como um intrão e sinais de poliadenilação de SV40. O vector pode ser propagado em *E. coli* devido à origem de replicação derivada de pUC19 e gene de resistência a ampicilina. Outros vectores adequados para a geração de construções de gene repórter estão disponíveis (e. g., incluindo mas não limitados a p β -Gal (repórter de β -galactosidase); Tropix).

São estabelecidas linhas celulares equivalentes de pele estáveis (e. g., NIKS) que contêm o gene repórter e estas células transfectadas são utilizadas para gerar equivalentes de pele *in vitro*. As células são, depois, utilizadas para monitorizar a expressão da construção de gene repórter em resposta a um painel de compostos irritantes (Ver o Exemplo 4).

A expressão pelo gene repórter pode ser medida utilizando qualquer ensaio adequado. Em algumas formas de realização preferidas, a presente invenção utiliza leituras de expressão génica de irritantes de pele por linhas celulares derivadas de NIKS albergando construções de gene repórter. A utilização desses ensaios aumenta a velocidade e diminui os custos de utilização dos ensaios para testagem de novos compostos. Por exemplo, em algumas formas de realização, são utilizados ensaios de gene repórter quimioluminescente que podem ser realizados em

30 minutos ou menos. O Exemplo 4 descreve um ensaio ilustrativo que encontra utilização na presente invenção.

ii) Rastreo para Novos Genes Responsivos e irritantes

Noutras formas de realização, o presente pedido proporciona métodos e composições para a identificação de novos genes responsivos e irritantes. Em algumas formas de realização, de modo a obter-se dados que se correlacionem bem com a exposição a irritantes na população geral, são ensaiadas alterações globais de expressão génica em culturas organotípicas de queratinócitos humanos primários de dadores agregados que foram expostos a irritantes de pele conhecidos. Os novos genes identificados pelos métodos do presente pedido encontram utilização em ensaios de testes de irritação, utilizando linhas celulares de gene repórter derivadas de equivalentes de pele (e. g., NIKS) e uma matriz de expressão génica preditora de irritação.

As matrizes de expressão génica têm sido utilizadas com sucesso para obter novos conhecimentos sobre as respostas globais de expressão génica de células de mamífero a soro (Iyer *et al.*, *Science* 283:83 [1999]) e vias de sinalização de factor de crescimento específicas (Fambrough *et al.*, *Cell* 97:727 [1999]). Além disso, foi recentemente estabelecido que a análise de aglomerados (Eisen *et al.*, *PNAS* 95:14863 [1998] de padrões de expressão génica pode distinguir e prever diferentes formas de cancro (leucemia mielóide aguda *versus* leucemia linfoblástica aguda) (Golub *et al.*, *Science* 286:531 [1999]). A análise da expressão de 6817 genes humanos nestas duas formas de cancro conduziu à geração de uma matriz “preditora” dos 50 genes mais informativos que distinguiram com sucesso um conjunto

independente de amostras de doentes (Golub *et al.*, *Supra*). Este é um poderoso exemplo da análise de matriz de ADN para derivar um subconjunto de genes conhecidos e novos, cujo padrão global pode distinguir as subtilezas de dois estados celulares de doença diferentes. Consequentemente, em algumas formas de realização, são utilizadas matrizes génicas para identificar novos genes segregados em resposta a irritantes conhecidos.

As matrizes de expressão génica estão disponíveis numa variedade de formatos a partir de um número de fontes comerciais, incluindo mas não limitadas a matrizes baseadas em filtros (Research Genetics and Clontech), matrizes de ADNc de lamela de vidro (Incyte-Genome Systems) e micromatrizes de ADN oligonucleotídico (Affymetrix). Em um exemplo ilustrativo (Exemplo 5), as micromatrizes de ADNc (Genome Systems) são utilizadas para rastrear queratinócitos humanos cultivados tratados com irritantes conhecidos.

Os métodos de rastreio do presente pedido são utilizados para gerar uma base de dados de alterações de expressão génica em queratinócitos humanos, em resposta a múltiplos irritantes de pele conhecidos. A informação contida na base de dados encontra utilização no desenvolvimento de matrizes de expressão génica preditoras de irritação. Essas matrizes são utilizadas para gerar um perfil de irritação que é susceptível de ser um melhor preditor de irritação de pele *in vivo* do que os ensaios de ponto final único actualmente em utilização. As leituras de expressão génica simples de irritantes de pele por linhas celulares derivadas de equivalentes de pele (e. g., NIKS), albergando construções de gene repórter, aumentarão a velocidade e diminuirão os custos de utilização destes ensaios para testagem de novos compostos.

3. Substratos para Cultivo de Tumores e Agentes Patológicos

Está contemplado que equivalentes de pele da presente invenção também são úteis para a cultura e estudo de tumores que ocorrem naturalmente na pele, assim como para a cultura e estudo de patógenos que afectam a pele. Consequentemente, em algumas formas de realização, está contemplado que os equivalentes de pele da presente invenção são semeados com células malignas. A título de exemplo não limitativo, os equivalentes de pele podem ser semeados com células SCC13y malignas, como descrito na Pat. U.S. Nº 5989837, para proporcionar um modelo de carcinoma espinocelular humano. Estes equivalentes de pele semeados podem, depois, ser utilizados para rastrear compostos ou outras estratégias de tratamento (e. g., radiação ou tomoterapia) para eficácia contra o tumor no seu ambiente natural. Deste modo, algumas formas de realização do presente pedido proporcionam métodos compreendendo proporcionar um equivalente de pele compreendendo células malignas ou um tumor e, pelo menos, um composto de teste, tratamento do equivalente de pele com o composto e ensaio do efeito do tratamento nas células malignas ou tumores. Noutras formas de realização do presente pedido, são proporcionados métodos que compreendem proporcionar um equivalente de pele compreendendo células malignas ou um tumor e, pelo menos, uma terapia de teste (e. g., radiação ou fototerapia) tratamento do equivalente de pele com a terapia e ensaio do efeito da terapia nas células malignas ou tumores.

Noutras formas de realização, os equivalentes de pele são utilizados para cultura e estudo de patógenos de pele. A título de exemplo não limitativo, os equivalentes de pele são

infectados com vírus do papiloma humano (HPV), tal como HPV18. Os métodos para preparação de equivalentes de pele infectados com HPV são descritos na Pat. U.S. N° 5994115. Deste modo, algumas formas de realização do presente pedido proporcionam métodos compreendendo proporcionar um equivalente de pele infectado com um patogénio de interesse e, pelo menos, um composto de teste ou tratamento e tratamento do equivalente de pele com o composto de teste ou tratamento. Em algumas formas de realização preferidas, os métodos compreendem, ainda, ensaiar o efeito do composto de teste ou tratamento no patogénio. Esses ensaios podem ser conduzidos pelo ensaio da presença, ausência ou quantidade do patogénio no substituto de pele após tratamento. Por exemplo, um ELISA pode ser realizado para detectar ou quantificar o patogénio. Em algumas formas de realização particularmente preferidas, o patogénio é patogénio viral, tal como HPV.

4. Oclusão de Feridas e Tratamento de Queimaduras

Os equivalentes de pele da presente invenção encontram utilização em aplicações de oclusão de feridas e tratamento de queimaduras. A utilização de auto-enxertos e aloenxertos para o tratamento de queimaduras e oclusão de feridas é descrita em Myers *et al.*, *A. J. Surg.* 170(1):75-83 (1995) e Pat. U.S. N° 5693332; 5658331; e 6039760. Em algumas formas de realização, os equivalentes de pele podem ser utilizados em conjunto com substituições dérmicas, tal como DERMAGRAFT. Noutras formas de realização, os equivalentes de pele são produzidos utilizando uma fonte corrente de queratinócitos (e. g., células NIKS) e queratinócitos do doente que irá receber o enxerto. Por conseguinte, o equivalente de pele contém queratinócitos de duas

fontes diferentes. Ainda em formas de realização adicionais, o equivalente de pele contém queratinócitos de um isolado de tecido humano. Consequentemente, o presente pedido proporciona métodos para a oclusão de feridas, incluindo feridas causadas por queimaduras, compreendendo proporcionar um equivalente de pele tendo função de barreira melhorada de acordo com a presente invenção e um doente sofrendo de uma ferida e tratamento do doente com o equivalente de pele, sob condições de modo a que a ferida seja ocluída.

5. Terapia Génica

Ainda em formas de realização adicionais, o equivalente de pele é manipulado para proporcionar um agente terapêutico a um indivíduo. De facto, está contemplado que uma variedade de agentes terapêuticos pode ser distribuída ao indivíduo, incluindo mas não limitada a enzimas, péptidos, hormonas peptídicas, outras proteínas, ARN ribossómico, ribozimas e ARN anti-sentido. Estes agentes terapêuticos podem ser distribuídos para uma variedade de efeitos, incluindo mas não limitados aos efeitos de correcção de defeitos genéticos. Em algumas formas de realização preferidas particulares, o agente terapêutico é distribuído para os efeitos de desintoxicação de um doente com um erro de metabolismo congénito hereditário (e. g., aninoacidopatese), no qual o enxerto serve como tecido de tipo selvagem. Está contemplado que a distribuição do agente terapêutico corrige o defeito. Em algumas formas de realização, os queratinócitos utilizados para formar o equivalente de pele são transfectados com uma construção de ADN codificando um agente terapêutico (e. g., insulina, factor IX de coagulação, eritropoietina, etc.) e o equivalente de pele é enxertado no

indivíduo. O agente terapêutico é, depois, distribuído na corrente sanguínea do doente ou outros tecidos do enxerto. Em formas de realização preferidas, o ácido nucleico codificando o agente terapêutico está ligado de modo operativo a um promotor adequado. A utilização de uma variedade de promotores está contemplada, incluindo mas não limitada a promotores indutíveis, constitutivos, específicos de tecido e específicos de queratinócitos. Em algumas formas de realização, o ácido nucleico codificando o agente terapêutico é introduzido directamente nos queratinócitos (*i. e.*, por co-precipitação por fosfato de cálcio ou por meio de transfecção de lipossomas). Em outras formas de realização preferidas, o ácido nucleico codificando o agente terapêutico é proporcionado como um vector e o vector é introduzido nos queratinócitos por métodos conhecidos na técnica. Em algumas formas de realização, o vector é um vector episomal, tal como um plasmídeo. Noutras formas de realização, o vector integra-se no genoma dos queratinócitos. Os exemplos de vectores de integração incluem mas não estão limitados a vectores retrovirais, vectores de vírus adeno-associados e vectores de transposões.

Experimental

Os seguintes exemplos são proporcionados de modo a demonstrar e ainda ilustrar determinadas formas de realização e aspectos preferidos da presente invenção e não podem ser considerados como limitando o seu âmbito.

Na divulgação experimental que se segue, aplicam-se as seguintes abreviaturas: eq (equivalentes); M (Molar); μ M (micromolar); N (Normal); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol

(micromoles); nmol (nanomoles); g (gramas); mg (miligramas); µg (microgramas); ng (nanogramas); l ou L (litros); mL (mililitros); µL (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); µm (micrómetros); nm (nanómetros); C (graus Centígrados); U (unidades), mU (miliunidades); min. (minutos); sec. (segundos); % (por cento); kb (quilobase); pb (par de bases); PCR (reacção em cadeia da polimerase); BSA (albumina de soro bovino).

Exemplo 1

Efeito de Condições de Cultura na Função de Barreira Epidérmica de Células NIKS

Embora se mostrasse que um número de condições de cultura melhora diversos aspectos da função de barreira (ver a Tabela 1, *supra*), não tem havido uma tentativa sistemática para examinar os efeitos sinérgicos destas condições. Este exemplo proporciona uma avaliação dos efeitos combinados de ácido ascórbico, activadores de PPAR (ácido linoleico), activadores de FXAR (farnesol) e humidade relativa reduzidas na função de barreira epidérmica de culturas organotípicas de NIKS. As propriedades de barreira de culturas tratadas são avaliadas pela medição da capacitância eléctrica de superfície (SEC) (Boyce *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, 107(1): p. 82-7 (1996)), análise da composição lipídica extracelular e por examinação ultra-estrutural de secções de tecido por microscopia electrónica.

As condições de cultura a serem avaliadas são apresentadas na Tabela 2. Os suplementos de cultura são adicionados

individualmente ou em combinação ao meio de cornificação, às concentrações indicadas. As culturas organotípicas são incubadas na interface ar/líquido, durante 14-17 dias, antes de análise. As culturas baseadas em NIKS consistem em compartimentos dérmicos e epidérmicos. O compartimento dérmico consiste numa base de colagénio e é formado pela mistura de fibroblastos neonatais humanos normais, estirpe CI-1-F, com colagénio de Tipo I, em meio F-12 de Ham contendo soro de vitelo fetal (FCS) a 10% e penicilina/estreptomicina (P/S) e permitindo contracção. O compartimento epidérmico é produzido por sementeira das células NIKS no gel de colagénio contraído em 25 μ L de uma mistura de F-12 de Ham:DME, (3:1, concentração de cálcio final de 1,88 mM) suplementado com FCS a 0,2%, hidrocortisona (HC) a 0,4 μ g/mL, toxina da cólera (CT) a 8,4 ng/mL, insulina (Ins) a 5 μ g/mL, adenina (Ade) a 24 μ g/mL e 100 unidades/mL de P/S. As células são deixadas conjugar-se, 2 horas antes de inundação da câmara de cultura com meios (dia 0). Nos dias 1 e 2, as células são realimentadas. No dia 4, as células são levantadas à interface de ar com uma almofada de algodão e mudadas para meio de cornificação contendo F-12 de Ham:DME, (3:1, concentração de cálcio final de 1,88 mM) suplementado com FCS a 2%, HC a 0,4 μ g/mL, CT a 8,4 ng/mL, Ins a 5 μ g/mL, Ade a 24 μ g/mL e P/S. As células são alimentadas com meio de cornificação fresco, de 3 em 3 dias.

Para medição da SEC, a impedância das superfícies de cultura é determinada utilizando um medidor de impedância Dermaphase 9003 (NOVA Technologies Corp, Portsmouth, NH). Este instrumento proporciona uma medida da condutividade eléctrica da superfície da pele, que está directamente relacionada com o estado de hidratação e propriedades de barreira da amostra. A sonda é colocada em contacto com a superfície de cultura e são

tomadas leituras imediatamente após contacto de sonda e no fim do período de 10 segundos. A leitura inicial é, depois, comparada com a leitura depois de a sonda ter estado no lugar durante 10 segundos. Um aumento na leitura após 10 segundos reflecte hidratação aumentada da superfície de cultura, devido a oclusão da superfície da pele pela sonda. Visto que a hidratação de superfície é largamente determinada pela permeabilidade do estrato córneo, a magnitude da diferença entre as leituras inicial e final de SEC proporciona uma medida das propriedades de barreira das culturas. Cada condição de cultura é analisada em triplicado e as medições de impedância média comparadas com condições de cultura padrão, não suplementadas, para avaliar melhoramentos na função de barreira. As leituras de SEC de culturas *in vitro* também são comparadas com as medições de SEC obtidas de pele humana normal. Estudos anteriores mostraram que os valores de SEC de substitutos de pele *in vitro* (400 pF) são cerca de dez vezes mais elevados do que os observados com pele humana normal. O objectivo destas experiências é desenvolver condições que melhorem a função de barreira de culturas organotípicas de queratinócitos, de modo a que as leituras de SEC destas culturas sejam, no máximo, 2-3 vezes mais elevadas do que a pele normal.

Tabela 2: Suplementos de Cultura e Humidade

Ácido ascórbico	Ácido Linoleico	Farnesol	Humidade
			100%
			75%
50 microgramas/mL			100%

(continuação)

Ácido ascórbico	Ácido Linoleico	Farnesol	Humidade
50 microgramas/mL			75%
	30 micromolar		100%
	30 micromolar		75%
		50 micromolar	100
		50 micromolar	75%
50 microgramas/mL	30 micromolar		100%
50 microgramas/mL	30 micromolar		75%
50 microgramas/mL		50 micromolar	100%
50 microgramas/mL		50 micromolar	75%
	30 micromolar	50 micromolar	100%
	30 micromolar	50 micromolar	75%
50 microgramas/mL	30 micromolar	50 micromolar	100%
50 microgramas/mL	30 micromolar	50 micromolar	75%

As composições lipídicas de substitutos de pele *in vitro* examinados até à data mostram diferenças significativas, em comparação com as verificadas em pele humana normal. Em particular, os níveis de ceramidas 6 e 7 são grandemente reduzidos nas culturas *in vitro*. Para determinar se a preparação de culturas organotípicas de pele utilizando as condições de cultura mostradas na Tabela 2 tem um efeito sinérgico na composição lipídica epidérmica, os perfis lipídicos de culturas suplementadas são comparados com lípidos isolados de culturas de controlo não suplementadas e com lípidos extraídos de pele humana normal. Os perfis lipídicos das culturas são determinados por cromatografia de camada fina de alta resolução (HPTLC) de

lípidos extraídos das camadas de cultura epidérmica. As culturas organotípicas são aquecidas a 60 °C, durante 1 min, para separar as camadas epidérmica e dérmica. Os lípidos totais são extraídos da camada epidérmica por extracção sequencial com 2 mL de clorofórmio/metanol (1:2), 2 mL de clorofórmio/metanol/água (1:2:0.5), 2 mL de clorofórmio/metanol (1:2), 2 mL de clorofórmio/metanol (2:1) e, finalmente, com 2 mL de clorofórmio. Após a adição de 0,2 mL de KCl a 2,5% e 2 mL de água, as amostras são centrifugadas e a fase inferior removida para um tubo limpo. A fase superior restante é extraída com 4 mL de clorofórmio. O extracto de clorofórmio é combinado com a fase inferior do extracto inicial. Os solventes são removidos por evaporação sob azoto e os lípidos extraídos são dissolvidos em clorofórmio/metanol (2:1). O teor de lípido total nos extractos é determinado pela pesagem de amostras do extracto após evaporação de solvente.

Os lípidos extraídos (50 microgramas) são aplicados a placas de sílica gel 60 HPTLC (Merck, Darmstad, FRG) e resolvidos por HPTLC de uma dimensão, utilizando o sistema de desenvolvimento de ceramida. A separação lipídica é alcançada por desenvolvimento sequencial de placas de HPTLC em clorofórmio, clorofórmio/acetona/metanol (76:8:16), clorofórmio/acetato de hexilo/acetona/metanol (86:1:10:4), clorofórmio/acetona/metanol (76:4:20), clorofórmio/éter dietílico/acetato de hexilo/acetato de etilo/acetona/metanol (72:4:1:4:16:4) e, finalmente, com hexano/éter dietílico/acetato de etilo (80:16:4). A placa de TLC é seca pouco após cada etapa de desenvolvimento, antes de se prosseguir para o próximo sistema de solventes. Após separação, os lípidos são detectados pela coloração com acetato de cobre e sulfato de cobre em ácido sulfúrico, seguida de carbonização. Cada condição de cultura é

analisada em triplicado e os níveis de componentes lipídicos específicos quantificados por densitometria e expressos como uma percentagem de lípido total. Estudos anteriores mostraram que as ceramidas 5-7 compreendem apenas 10% da massa de ceramida total de substitutos de pele *in vitro*, em comparação com 39% na epiderme normal. Existe um aumento correspondente na ceramida 2 nas culturas *in vitro* que compreende, aproximadamente, 50% da massa de ceramida total, em comparação com 22% na pele normal. Em formas de realização preferidas, os equivalentes de pele da presente invenção são cultivados sob condição que resulta num aumento no teor de ceramidas 5-7 para entre 30-45% da massa de ceramida total e uma redução dos níveis de ceramida 2 para entre 20-30% da massa de ceramida total.

A ultra-estrutura das lamelas lipídicas em culturas organotípica preparadas sob as condições descritas na Tabela 2, é examinada por microscopia electrónica. As culturas são fixadas em glutaraldeído a 2% e formaldeído a 2% em tampão de cacodilato a 0,1 M, pH 7,4, depois, pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, seguido de tetróxido de ruténio a 0,25%. As amostras são desidratadas através de uma série de etanol, embebidas em Eponato e seccionadas num micrótomo Reichert Ultracut. As secções são coradas com acetato de uranilo e citrato de chumbo e examinadas utilizando um microscópio electrónico H-7000 Hitachi (Hitachi, San Jose, CA). As culturas organotípicas produzidas pelas condições listadas na Tabela 2 são examinadas para restabelecimento do padrão de lamelas lipídicas electronicamente luzentes e electronicamente densas alternadas verificado em pele normal.

As culturas organotípicas também são avaliadas para marcadores de proliferação celular e diferenciação específica de

tipo de célula, incluindo involucrina, transglutaminase e queratinas.

Exemplo 2

Expressão de Klf4 Exógeno em Células NIKS

Este exemplo descreve a expressão de Klf4 exógeno em células NIKS. O factor de transcrição, factor 4 semelhante a Krüppel (Klf4), é uma proteína de dedo de zinco expressa a elevados níveis em epitélio sofrendo diferenciação terminal, especialmente epitélio de pele e intestinal. Na pele, está enriquecido na camada suprabasal mitoticamente inactiva da epiderme. O Klf4 foi identificado por hibridação de baixa estricção com uma sonda para um domínio de dedo de zinco numa biblioteca de ADNc de células NIH 3T3 (Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(33): 20009-17 (1996)). Os seus três dedos de zinco de C2H2 relacionam-no com uma família de factores de transcrição de dedos de zinco que inclui EKLF e LKLF, factores que são importantes para diferenciação específica de tecido. É expresso a níveis mais elevados em células com crescimento interrompido e a níveis indetectáveis em células em proliferação. A expressão constitutiva de células COS-1 de Klf4 inibe a síntese de ADN. Liga-se a uma sequência de ADN definida que é importante na regulação do gene CYP1A1 de citocromo P450 (Zhang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273(28): 17917-25 (1998)). A ligação de Klf4 ao seu sítio de ligação em CYP1A1 inibe a expressão de CYP1A1, provavelmente por competição pela ligação de ADN com SP1 e através de interacções directas de proteína-proteína com SP1. Estudos recentes referem que o Klf4 também pode regular a sua própria expressão e que uma importante interacção de ligação é

com p300/CBP (Geiman *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 28(5): 1106-1113 (2000); Mahatan *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 27(23): 4562-9 (1999)). Como é verdadeiro com outros factores de transcrição chave, o Klf4 pode ser um potente activador de alguns genes e um repressor de outros.

O Klf4 é actualmente o melhor gene candidato para um regulador chave da função de barreira na pele. A eliminação da expressão de Klf4 em murganhos resulta em letalidade neonatal, aparentemente como resultado de excessiva perda de água através de uma barreira de permeabilidade epidérmica defeituosa. Estas observações sugerem que o Klf4 regula genes que são essenciais para a formação de uma barreira de permeabilidade epidérmica normal e levantam a possibilidade de que a expressão de Klf4 em substitutos de pele cultivados poderá melhorar a função de barreira destas culturas. Este Exemplo descreve dois métodos de expressão de Klf4 em queratinócitos em diferenciação. O primeiro método é a geração de uma construção de expressão indutível, na qual a expressão de Klf4 humano é regulada pela presença ou ausência do derivado de tetraciclina, doxíciclina, no meio de cultura. Um segundo método de dirigir a expressão de Klf4 em culturas organotípicas utiliza um fragmento de ADN contendo 3,7 kb da região do promotor de involucrina, que dirige a expressão em queratinócitos em diferenciação (Carroll *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(21): p. 10270-4 (1993)) ou 135 pb da região do promotor de transglutaminase 3, que também dirige a expressão em queratinócitos em diferenciação (Lee *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(8): 4561-8 (1996)).

O ADNc codificando Klf4 humano é isolado por PCR utilizando iniciadores para a sequência de Klf4 conhecida (Y et *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273(2): 1026-31 (1998)). O ADNc de Klf4 é clonado

no vector de expressão pTRE2 (Clontech, Palo Alto, CA), que contém um promotor de CMV mínimo, flanqueado por sete repetições do operador tet (tetO). A integridade do ADNc de Klf4 clonado é verificada por análise de sequência utilizando iniciadores derivados da sequência de Klf4 conhecida.

O ADN purificado do plasmídeo de expressão de Klf4 é introduzido em células NIKS, juntamente com o plasmídeo pTet-On (Clontech, Palo Alto, CA), que codifica um derivado da proteína do repressor tet. Esta proteína, rtTA, liga-se ao operador tet na presença de doxíciclina e induz a expressão de Klf4 quando a doxíciclina está presente no meio de cultura. O gene codificando uma proteína que confere resistência a blasticidina será amplificado por PCR e clonado no plasmídeo pTet-On, para permitir para selecção de células transfectadas de modo estável. As células transfectadas são seleccionadas por crescimento em meios contendo blasticidina (5 microgramas/mL), que irá provocar a morte a quaisquer células NIKS que não tenham incorporado o plasmídeo no seu genoma. As linhas celulares estáveis que contêm os plasmídeos pTRE2-Klf4 e pTet-On são identificadas pela examinação de linhas celulares clonais múltiplas por transferência de Southern, utilizando sondas marcadas com digoxigenina derivadas dos plasmídeos pTet-On e pTRE2. Múltiplos clones que contêm cópias intactas dos plasmídeos pTet-On e pTRE2 são isolados e examinados para expressão do transgene de Klf4 na presença de doxíciclina.

Para examinar a expressão do transgene de Klf4, culturas de monocamada de linhas celulares transfectadas de modo estável e células não transfectadas de controlo são incubadas em meio contendo doxíciclina (1 micrograma por mL). O ARN total é, depois, isolado de culturas em múltiplos intervalos de tempo

após adição de doxiciclina utilizando o Reagente Trizol (Life Technologies, Rockville, MD). Vinte microgramas de ARN total são analisados por hibridação de transferência de Northern utilizando sondas marcadas com digoxigenina derivadas do ADNc de Klf4 clonado e detectadas utilizando o sistema de detecção não radioactivo Genius (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). O ARN também é isolado de culturas transfectadas cultivadas na ausência de doxiciclina, para determinar o nível basal de expressão de Klf4 do transgene. O ARN isolado de células não transfectadas em cada intervalo de tempo será analisado para estabelecer um nível de fundo de expressão de Klf4 do gene de Klf4 endógeno.

O ADNc de Klf4 também é clonado num plasmídeo de expressão contendo sequências promotoras do gene de involucrina. Um fragmento de ADN contendo 3,7 kb do promotor de involucrina dirige a expressão de transgene para as camadas suprabasais da epiderme. Este fragmento de promotor é amplificado de ADN genómico total por PCR, utilizando iniciadores para a sequência promotora de INV conhecida (Lopez-Bayghen *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271(1): 512-520 (1996)). O ADNc de Klf4 é clonado num plasmídeo contendo este fragmento de promotor de involucrina e utilizado para gerar linhas celulares estáveis de NIKS que contêm este transgene. As linhas celulares estáveis são seleccionadas por co-transfecção das células NIKS com o plasmídeo INV/Klf4 e um plasmídeo expressando o gene de resistência a blasticidina e cultivo das células transfectadas na presença de blasticidina. Múltiplas linhas celulares resistentes a blasticidina serão isoladas e examinadas por transferência de Northern para expressão de Klf4 aumentada, em comparação com células transfectadas apenas com o plasmídeo de resistência a blasticidina.

Embora o promotor de involucrina tenha sido utilizado com sucesso para dirigir a expressão de vários transgenes para a epiderme em diferenciação, é possível que a construção de INV/KLF4 não seja expressa a níveis suficientemente elevados ou no padrão temporal ou espacial apropriado para ter um efeito na função de barreira. Se a expressão de Klf4 da construção do promotor de involucrina não for facilmente detectada, são geradas construções de expressão contendo as regiões promotoras de outro gene específico de queratinócitos, transglutaminase 3. O ADNc de Klf4 é clonado num plasmídeo de expressão contendo sequências promotoras do gene de transglutaminase 3 (TG3). Um fragmento do promotor de TG3 contendo 126 pb a montante e 10 pb a jusante do sítio de iniciação de transcrição dirige a expressão do transgene para células epiteliais (Lee et al., *J Biol Chem*, 271(8): 4561-8 [1996]).

O ADNc de Klf4 é clonado num plasmídeo contendo este fragmento de promotor de TG3 e gerar linhas celulares estáveis de NIKS que contêm este transgene. As linhas celulares estáveis são seleccionadas por co-transfecção das células NIKS com o plasmídeo TG3/Klf4 e um plasmídeo expressando o gene de resistência a blasticidina e cultivo das células transfectadas na presença de blasticidina. Múltiplas linhas celulares resistentes a blasticidina são isoladas e examinadas por transferência de Northern para expressão de Klf4 aumentada, em comparação com células transfectadas apenas com o plasmídeo de resistência a blasticidina.

As linhas celulares de NIKS estáveis que expressam Klf4 do promotor de involucrina ou do sistema indutível de doxiciclina são examinadas em cultura organotípica para confirmar que o Klf4 é expresso sob estas condições de cultura. Os meios e processos

correntes para culturas organotípicas são descritos no Exemplo 1. Células NIKS expressando Klf4 são semeadas numa matriz de colagénio contraído contendo fibroblastos e cultivadas em cultura submersa, durante 4 dias, antes de ser levantada à interface de ar. As culturas organotípicas são alimentadas com meio de cornificação, de 3 em 3 dias e mantidas na interface ar/líquido, durante 14 dias, para formar um epitélio estratificado. As culturas com NIKS expressando Klf4 do promotor indutível são cultivadas em meios contendo 1 micrograma/mL de doxiciclina. O ARN total é isolado das culturas organotípicas pela homogeneização da camada epidérmica em reagente Trizol, extracção do homogeneizado com clorofórmio e precipitação de ARN total com isopropanol. O ARN é examinado para expressão de Klf4, como descrito acima para culturas de monocamada.

Os efeitos da expressão de Klf4 na função de barreira são examinados por medição de capacitância de superfície, composição lipídica e ultra-estrutura das culturas organotípicas pelos métodos descritos no Exemplo 1. Além disso, alguns dos agentes a serem adicionados às culturas no Exemplo 1, especialmente os activadores PPAR e FXAR, podem servir para activar outros genes regulatórios que actuam em concertação com Klf4. Esta hipótese é suportada pela capacidade de estes agentes acelerarem o desenvolvimento *in utero* da função de barreira.

Os dados sobre o momento e extensão da expressão de Klf4 utilizando os dois sistemas de expressão aqui descritos permitirá a concepção de estratégias para melhorar a função de barreira, pela regulação da expressão de Klf4 em culturas organotípicas de NIKS. As culturas organotípicas de NIKS foram extensamente caracterizadas para ultra-estrutura e expressão de marcadores de diferenciação chave. A examinação destas

propriedades fenotípicas da cultura na presença de expressão de Klf4 adicionada proporcionará pistas adicionais para as consequências da expressão de Klf4.

Exemplo 3

Secreção de IL-1 α em Resposta a Irritantes de Pele

Este exemplo demonstra que as células NIKS segregam IL-1 α em resposta a irritantes de pele. Para determinar se as culturas organotípicas de células NIKS exibem respostas a irritantes típicas de queratinócitos primários, culturas de equivalentes de pele de NIKS foram expostas a concentrações de SDS que são conhecidas por deduzirem respostas irritantes de pele *in vivo* e *in vitro*. Soluções de SDS (0,1%, 0,2% e 0,5%) foram aplicadas topicamente a culturas organotípicas de NIKS expostas ao ar e incubadas, durante 24 h, a 37 °C. Após 24 h, os meios debaixo das culturas foram ensaiados para proteína de IL-1 α utilizando um kit de ELISA de IL-1 α Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN) e as culturas foram incubadas com o reagente MTS (Promega Corp., Madison, WI) para determinar a viabilidade celular. As concentrações de IL-1 α em meios de culturas de controlo e tratadas com SDS são mostradas na Figura 3. Os meios de culturas não tratadas continham IL-1 α a 25 pg/mL, ao passo que a concentração de IL-1 α em culturas tratadas com SDS a 0,1%, 0,2% ou 0,5% foi 290, 375 e 275 pg/mL, respectivamente.

Estes valores correspondem bem a respostas publicadas de IL-1 α em equivalentes de pele expostos a SDS (Perkins *et al.*, *Toxicological Sciences*, 48:218 [1999]). A diminuição na secreção de IL-1 α em culturas tratadas com SDS a 0,5% deve-se,

provavelmente, a viabilidade celular diminuída nestas culturas, com detectado por um ensaio de MTS.

Exemplo 4

Geração de Construções de Gene Repórter

Este exemplo descreve métodos para geração de células NIKS compreendendo construções de gene repórter compreendendo fragmentos do promotor de IL-8. Utilizando iniciadores para a sequência conhecida, é utilizado PCR para amplificar um fragmento de ADN de 1,5 kb contendo o promotor de IL-8 e sequências flanqueantes. Após verificação do ADN amplificado por análise de sequência, este fragmento de ADN é clonado no vector de expressão pSEAP (Tropix, Bedford, MA), que contém a região codificante para SEAP, mas que está desprovido elementos regulatórios para dirigir a sua expressão. A integridade da construção de repórter é verificada por análise de restrição e sequenciação de ADN.

Inicialmente, as experiências para determinar se a construção de repórter de IL-8/SEAP é indutível por irritantes são realizadas com células NIKS transfectadas de modo transiente. Agregados de células transfectadas são expostos a irritantes conhecidos (e. g., SDS, ácido trans-retinóico) e a substâncias de controlo (e. g., óleo mineral, água) e a quantidade de actividade de SEAP é determinada por quimioluminescência, a 4, 8 e 24 h, após exposição a irritante. A actividade de SEAP é detectada por incubação dos meios de células transfectadas com um substrato quimioluminescente (Phospha-light, Tropix, Bedford, MA), utilizando um luminómetro

de microplacas. A análise da expressão do gene repórter IL-8/SEAP é realizada em triplicado, utilizando populações celulares transfectadas independentemente.

A expressão de ARN do repórter IL-8/SEAP é comparada com aumentos no ARNm do gene de IL-8 endógeno. Em paralelo com os ensaios de SEAP descritos acima, o ARN é isolado de culturas tratadas de modo idêntico, utilizando o reagente Trizol (Life Technologies, Rockville, MD). Como uma medição independente da expressão de IL-8 em queratinócitos tratados com irritante, as culturas de queratinócitos primários de doadores agregados são tratadas com os irritantes e processadas para purificação de ARN. O ARN total é examinado por transferência de Northern para expressão aumentada do gene de IL-8 endógeno, utilizando um fragmento de PCR amplificado baseado em sequências conhecidas. O nível de ARNm de SEAP expresso do transgene de IL-8/SEAP também é quantificado por análise de Northern. Aumentos na actividade de SEAP, como medido por quimioluminescência, e ARNm de SEAP, determinado por transferência de Northern, são comparados com aumentos em ARNm de IL-8, para determinar se a expressão do repórter de SEAP reflecte com precisão a indução de IL-8 em resposta a irritantes.

A expressão de ARNm de IL-8 aumenta 7 a 40 vezes, após exposição de 24 h a diversos irritantes de pele (de Brugerolle de Fraissinette *et al.*, *supra*). A construção de repórter é considerada indutível por irritante se o nível de actividade de SEAP e ARNm aumentar, pelo menos, 5 vezes em culturas tratadas com irritante.

Se a actividade de SEAP for aumentada em células NIKS transfectadas após exposição a irritante, linhas celulares

estáveis são geradas com a construção de repórter de IL-8/SEAP como se segue. As células NIKS são co-transfectadas com a construção de repórter de IL-8/SEAP e um plasmídeo que confere resistência a blasticidina (pCMV/bsd Invitrogen, Carlsbad, CA). As células transfectadas são cultivadas na presença de blasticidina para seleccionar para células transfectadas de modo estável. Os clones individuais de células transfectadas são examinados para expressão do gene repórter de IL-8/SEAP em resposta a irritantes. Os clones que exibem expressão de transgene indutível por irritante são utilizados para gerar culturas de pele organotípicas. Estas culturas são examinadas para responsividade a irritante por aplicação tópica de SDS, ácido trans-retinóico e controlos negativos (água, óleo mineral), como descrito acima. As culturas organotípicas também podem ser mecanicamente dissociadas, lisadas em tampão contendo um detergente não iónico e ensaiadas para actividade de SEAP.

Porque o fragmento de 1,5 kb da região regulatória de IL-8 pode não conter a totalidade dos elementos regulatórios necessários para responsividade total, é possível que a magnitude da resposta do gene repórter possa ser inferior à observada com o gene de IL-8 endógeno. Se este fragmento for insuficiente para dirigir a expressão específica de irritante de SEAP, o produto de PCR é utilizado como uma sonda para rastrear uma biblioteca de ADN genómico. Esta abordagem permite a recuperação de fragmentos de ADN maiores que são susceptíveis de conter mais da região regulatória de IL-8. Estes fragmentos de ADN são caracterizados por mapeamento de restrição e análise de sequência. Os fragmentos de ADN contendo entre 5 e 10 kb de ADN genómico flanqueando o promotor de IL-8 são clonados no vector pSEAP e examinados para a capacidade de dirigirem expressão de SEAP indutível por irritante, como descrito acima.

Construções de gene repórter alternativas também são geradas utilizando um fragmento de ADN contendo a região regulatória de outra citocina indutível por irritante, IL-1 α . As sequências publicadas para este gene incluem 1437 pb de ADN a montante do sítio de iniciação de transcrição (Furutani *et al.*, *Nuc. Acid Res.* 14:3167 [1986]). Um fragmento de ADN contendo estas sequências foi utilizado para dirigir a expressão de um gene repórter de CAT em resposta a transactivadores virais (Mori e Prager, *Blood* 87:3410 [1996]). Este fragmento contém dois sítios de ligação para NF- κ B, um factor de transcrição que está envolvido em alterações de expressão génica em resposta a irritantes de pele (Corsini *et al.*, *J. Invest Dermatol.* 108:892 [1997]).

Além disso, uma construção de gene repórter de linha celular de NIKS também é gerada pela introdução de uma construção de gene repórter no locus de IL-8 endógeno em células NIKS. Esta estratégia de “knock-in” foi utilizada para reproduzir com precisão a expressão temporal e espacial apropriada de genes repórter (Elefanty *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:11897 [1998]; Morrison *et al.*, *Mech Dev*, 1999. 84169 [1999]; Jin *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 270:978 [2000]).

Exemplo 5

Identificação de Genes Responsivos e irritantes

Este exemplo descreve experiências úteis para a identificação de novos genes cuja expressão é induzida por

exposição a irritante. A micromatriz de ADNc da Genome Systems (GEM microarrays; Incyte Genomics, Palo Alto, Califórnia) é utilizada para a análise da expressão génica. Todas as manipulações são realizadas pela Incyte Genomics. É utilizada uma Micromatriz UniGEM V 2.0, construída a partir de clones de ADNc de sequência verificada pela Incyte e contendo 8514 ADNc humanos únicos. Matrizes maiores são utilizadas à medida que ficam disponíveis.

As culturas de equivalentes de pele *in vitro* são preparadas utilizando queratinócitos humanos cultivados de dadores adultos agregados (disponíveis da Clonetics, Walkersville, MD). Os queratinócitos cultivados são semeados num equivalente dérmico, consistindo em fibroblastos dérmicos embebidos numa matriz de colagénio contraído e a cultura organotípica resultante é levantada à interface de ar, para induzir a diferenciação e estratificação da camada de queratinócitos. Após 14 dias, as culturas organotípicas são tratadas topicamente com irritantes conhecidos (e. g., SDS a 0,2%, calcipotriol a 0,005%, ácido trans-retinóico a 0,025%) ou controlos não irritantes (e. g., óleo mineral, vaselina), durante 24 h. Estes compostos induzem todos expressão e secreção das citocinas IL-1 α e IL-8 pró-inflamatórias em equivalentes de pele tratados com irritante (de Brugerolle de Fraissinette *et al.*, *supra*).

A purificação de ARNm das culturas organotípicas é efectuada utilizando processos conhecidos. A camada de controlo epidérmica e culturas organotípicas expostas a irritante são mecanicamente desalojadas do equivalente dérmico de colagénio e colocadas em reagente Trizol (Life Technologies, Rockville, MD), durante 1 h. Após vortexação e pipetagem periódicas para quebrar o tecido, o ARN é separado de proteína celular e ADN por extracção de fenol-clorofórmio. A fase aquosa desta extracção é,

depois, tratada com etanol para precipitar o ARN total. O ARNm poli A⁺ é isolado de ARN celular total utilizando o sistema de purificação de ARNm Oligotex (Qiagen, Valencia, CA).

Para verificar que as culturas tratadas exibem uma resposta irritante, quantidades iguais de ARNm de culturas de controlo e tratadas com irritante são examinadas por transferência de Northern, para indução dos genes de IL-1 α e IL-8 conhecidos responsivos e irritantes. O ARN de culturas que exibem indução da expressão de IL-1 α e IL-8 é comparado com ARN de culturas de controlo por perfil de expressão génica, para identificar novos genes responsivos e irritantes. O ARNm purificado é dissolvido em tampão de TE, a uma concentração de 50 ng/ μ L e enviado para a Incyte Genomics para análise de micromatriz de ADNc. A análise de dados é realizada utilizando o Software GEMTools da Genome Systems e programas de análise de aglomerado, disponíveis a partir do MIT Center for Genome Research e do laboratório de Patrick O. Brown na Universidade de Stanford.

Os genes identificados como responsivos a irritante são utilizados em ensaios de gene repórter utilizando os métodos descritos no Exemplo 4 acima.

Exemplo 6

Teor Lipídico de Equivalentes de Pele

Este exemplo descreve a preparação de equivalentes de pele com meio isento de soro otimizado e um segundo conjunto de equivalentes de pele preparado com meio sub-ótimo.

Subsequentemente, o teor lipídico das culturas resultantes foi determinado.

As culturas organotípicas foram iniciadas pelo plaqueamento de 350000 células NIKS em equivalentes dérmicos anteriormente preparados num inserto de MILLICELL de 10 mm. Os meios utilizados para completar esta etapa eram constituídos por um meio de base [3:1 de mistura de meio F12 de Ham/meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME), suplementado com adenina a 24 µg/mL, toxina da cólera a 8,3 ng/mL, insulina a 5 µg/mL, hidrocortisona a 0,4 µg/mL, com a concentração de cálcio final ajustada para 1,88 mM] suplementado com Clone II Fetal a 0,2% (um substituto de soro de vitelo).

Dois dias pós-plaqueamento foi proporcionado meio fresco às culturas organotípicas para manutenção do crescimento. Foi proporcionado às culturas meio de base suplementado com Clone II Fetal a 0,2% ou meio de base suplementado com Clone II Fetal a 0,2% e constituintes adicionais (BSA isenta de endotoxina a 1 mg/mL, factor de crescimento epidérmico a 1 ng/mL, ácido ascórbico a 50 µg/mL, isoproterenol a 1 µM, carnitina a 10 µM, serina a 10 µM, ácido oleico a 25 µM, ácido linoleico a 15 µM, ácido araquidónico a 7 µM e α -tocoferol a 1 µM).

Quatro dias pós-levantamento e de dois em dois dias para o período restante da cultura, foi proporcionado às culturas meio óptimo (meio de base suplementado com BSA isenta de endotoxina a 1 mg/mL, factor de crescimento epidérmico a 1 ng/mL, ácido ascórbico a 50 µg/mL, isoproterenol a 1 µM, carnitina a 10 µM, serina a 10 µM, ácido oleico a 25 µM, ácido linoleico a 15 µM, ácido araquidónico a 7 µM e α -tocoferol a 1 µM) ou um meio sub-óptimo (meio de base suplementado com BSA isenta de endotoxina a

1 mg/mL, factor de crescimento epidérmico a 1 ng/mL, carnitina a 10 µM e serina a 10 µM).

Na conclusão do período de cultura, os lípidos totais foram extraídos das culturas e resolvidos por cromatografia de camada fina de alta resolução (HPTLC). Após separação, as placas foram carbonizadas e os cromatogramas resultantes foram rastreados por densitometria para quantificar espécies lipídicas individuais. As culturas cultivadas em meio de cultura otimizado continham uma percentagem mais elevada de ceramidas totais do que as culturas cultivadas em meio sub-ótimo (Tabela 3). Além disso, as culturas cultivadas em meio ótimo continham níveis muito maiores das ceramidas 3, 4, 5, e 6 polares do que as culturas cultivadas sob condições sub-ótimas.

Tabela 3		
Teor de ceramida de culturas de pele		
	Meios ótimos	Meios sub-ótimos
Cer 6II		0,07%
Car 6I	0,41%	0,03%
Cer 4/5	1,31%	0,46%
Cer 3	1,37%	0,44%
Cer 2	2,09%	1,69%
Cer 1	1,33%	0,42%
Ceramida total	6,52%	3,11%

Exemplo 7

Expressão de GKLF em células NIKS

Este exemplo descreve a expressão em células NIKS de GKLF, uma proteína que se pensa que medeia o desenvolvimento de função de barreira em murganhos.

O ADN codificando a proteína de GKLF foi isolado por PCR e clonado num vector de expressão contendo o promotor de involucrina humana. Após verificação do GKLF e fragmentos de involucrina por sequenciação de ADN, as construções foram introduzidas em células NIKS por transfecção. Vinte e quatro horas após transfecção, o ARN total foi isolado das células transfectadas e a expressão de GKLF nestas células foi examinada por transcrição reversa/PCR (RT-PCR).

Um produto de PCR correspondendo a ARNm de GKLF excisado foi detectado no ARN de células transfectadas com a construção de involucrina/GKLF, mas não em ARN de controlo de células transfectadas com vector vazio. Além disso, o produto de PCR de GKLF não foi detectado em reacções a partir das quais a transcriptase reversa foi omitida. Estes resultados demonstram que o ARNm de GKLF era expresso em células NIKS transfectadas.

Num segundo conjunto de experiências, o ADN codificando GKLF foi clonado no vector pTRE2 que permite para a expressão indutível de GKLF após adição de doxíciclina. Após verificação do GKLF e fragmentos de involucrina por sequenciação de ADN, as construções foram introduzidas em células NIKS por transfecção. Oito horas após transfecção, doxíciclina foi adicionada a metade das culturas transfectadas e todas as culturas foram incubadas

durante 16 horas adicionais. Vinte e quatro horas após transfecção, o ARN total foi isolado das células transfectadas e a expressão de GKLF nestas células foi examinada por transcrição reversa/PCR (RT-PCR). Um produto de PCR correspondendo a ARNm de GKLF excisado foi observado em amostras com e sem doxíciclina, mas mais produto foi verificado em amostras após adição de doxíciclina. Não foram detectados produtos de PCR em reacções a partir das quais a transcriptase reversa foi omitida. Estes resultados demonstram expressão indutível de ARNm de GKLF em células NIKS transfectadas.

Exemplo 8

Métodos de Cultura

Este exemplo descreve métodos de cultura comuns aos seguintes Exemplos.

Meios. O processo de cultura organotípica utiliza seis meios de cultura diferentes: meio de células alimentadoras 3T3 (TM); meio de crescimento de fibroblastos (FM); meio de NIKS (NM); meio de plaqueamento (PM); meio A de estratificação (SMA); e meio B de estratificação (SMB). O TM é utilizado para propagar células 3T3 que actuam como células alimentadoras para células NIKS em cultura de monocamada. O TM é uma mistura do meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME, GibcoBRL) suplementado com soro de vitelo a 10% (Hyclone). O FM é uma mistura de meio F-12 de Ham (GibcoBRL) e soro de Clone II Fetal a 10% (Hyclone). O NM é utilizado para cultivar queratinócitos de NIKS. O NM é uma mistura 3:1 de meio F-12 de Ham (GibcoBRL) e DME suplementado com Clone II Fetal a 2,5% (Hyclone), hidrocortisona a 0,4 µg/mL

(Calbiochem), toxina da cólera a 8,4 ng/mL (ICN), insulina 5 µg/mL (GibcoBRL), adenina a 24 µg/mL (Sigma) e factor de crescimento epidérmico a 10 ng/mL (EGF, R&D systems). O PM é o meio utilizado quando as células NIKS são semeadas num equivalente dérmico. O PM é o mesmo que o NM, excepto que o EGF é removido, CaCl_2 (Sigma) é suplementado para uma concentração de cálcio final de 1,88 mM e apenas soro de Clone II Fetal a 0,2% é adicionado. O SMA é o mesmo que o PM, com a adição de albumina de soro bovino a 1 mg/mL (BSA), isoproterenol a 1 µM, carnitina a 10 µM, serina a 10 µM, ácido oleico a 25 µM, ácido linoleico a 15 µM, ácido araquidónico a 7 µM, α -tocoferol a 1 µM, ácido ascórbico a 0,05 mg/mL (todos da Sigma) e EGF a 1 ng/mL. O SMB é utilizado durante a fase de estratificação epidérmica de crescimento de equivalente de pele de STRATATEST e equivalente de pele de STRATAGRAFT. O SMB é o mesmo que o SMA mas sem a presença do suplemento de soro de Clone II Fetal.

Preparação de alimentadoras. Antes de se iniciar as culturas organotípicas de equivalente de pele de STRATATEST ou equivalente de pele de STRATAGRAFT, as células alimentadoras 3T3 são preparadas e, depois, utilizadas de fresco ou congeladas para utilização posterior. As células 3T3 são cultivadas até confluência e tratadas com mitomicina C (4 µg/mL de mitomicina C em TM, Roche), durante duas horas. As células são, depois, lavadas, ressuspensas e plaqueadas a uma densidade de $1,25 \times 10^6$ por placa de cultura de tecidos de 100 mm para suportar o crescimento de NIKS. Se forem utilizadas alimentadoras congeladas, uma única ampola congelada contendo 1 mL com $2,5 \times 10^6$ é descongelada, diluída com TM fresco e plaqueada em uma ou mais placas de cultura de tecidos de 100 mm. Isto é feito para tantas placas quantas as necessárias para o crescimento de células NIKS um dia antes do plaqueamento das células NIKS.

Preparação de equivalente dérmico. As células NHDF congeladas são descongeladas e plaqueadas. As células são alimentadas com FM no dia seguinte para remover crioprotector residual e, subsequentemente, para manter o crescimento celular. As células NHDF pré-confluentes são recolhidas para utilização no equivalente dérmico. Para preparar o equivalente dérmico, colagénio de tendão de cauda de rato (Tipo I, Becton-Dickinson) é, em primeiro lugar, diluído para 3 mg/mL em ácido acético a 0,03 N e arrefecido sobre gelo. Uma mistura de meio F12 de Ham concentrado (8,7X a concentração normal, tamponado com HEPES a pH 7,5) é misturada com Clone II Fetal. Estas duas soluções são 11,5 e 10% do volume de solução final. É adicionado NaOH a 1 N à mistura de meio (2,5% da solução final). O colagénio diluído (74%) é, depois, adicionado à mistura. Um volume a 2% de fibroblastos suspensos ($2,5 \times 10^6$ células/mL para o equivalente dérmico de STRATATEST e 1×10^6 para o equivalente dérmico de STRATAGRAFT) é adicionado à mistura. A solução é misturada suavemente mas exaustivamente. São aliqüotados 100 µL em insertos de cultura de tecidos (MILLICELL da Millipore Corp.) colocados 25 numa placa de cultura de tecidos de 100 mm para STRATATEST. O equivalente de pele de STRATAGRAFT utiliza os insertos de TRANSWELL da Corning. Um equivalente dérmico de 13 mL é vertido em cada inserto tornando-o aproximadamente três vezes mais espesso do que um equivalente dérmico de STRATATEST. Após 30 minutos para formação de gel, a placa contendo equivalente dérmico de STRATATEST é inundada com 20 mL de FM. Uma ou duas gotas de FM são colocadas na superfície de cada equivalente dérmico de STRATATEST. Para equivalentes dérmicos de STRATAGRAFT, 80 mL de FM são colocados em volta do inserto de TRANSWELL numa placa de cultura de tecidos de 150 mm e 10 mL são colocados no topo do equivalente dérmico. Os insertos são

colocados em incubadora a 37 °C, CO₂ a 5%, 90% de humidade relativa, até utilização. Um dia antes da sementeira dos equivalentes dérmicos com células NIKS, são levantados à interface de ar, pela sua colocação numa malha de aço inoxidável estéril, com duas almofadas de mecha (S&S Biopath) por cima para fornecer o meio através da parte de baixo do inserto da cultura de tecidos.

Crescimento e Sementeira de NIKS. As alimentadoras são preparadas de fresco ou descongeladas e plaqueadas em TM um dia antes do plaqueamento de NIKS. As células NIKS são plaqueadas nas alimentadoras, a uma densidade de, aproximadamente, 3×10^5 células por placa de 100 mm. Se as células NIKS forem descongeladas de novo, são alimentadas com NM fresco, um dia após plaqueamento para remover crioprotector residual. As células NIKS são alimentadas com NM para manutenção do crescimento, conforme requerido. Quando a célula se aproxima da confluência, as células NIKS são recolhidas, contadas e ressuspensas em PM. $4,65 \times 10^5$ células NIKS/cm² são semeadas na superfície dos equivalentes dérmicos de MIILLICELL ou TRANSWELL que foram levantados à interface de ar, durante um dia. As placas são alimentadas com PM para inundar por baixo o elevador de metal e colocadas de novo na incubadora. Dois dias mais tarde, as culturas são alimentadas com SMA. Após dois dias adicionais, as culturas são alimentadas com SMB e transferidas para uma incubadora com 75% de humidade, onde permanecem, mantidas com alimentações de SMB adicionais, até maturidade.

Exemplo 9

Este exemplo descreve a preparação de equivalentes dérmicos utilizando colagénio a 1 mg/mL. Resumidamente, 24 mL de meio F12 de Ham, preparado a concentração de 10X, foram misturados com 4,8 mL de H₂O estéril, 2,4 mL de mistura de Penicilina/Estreptomicina e 24 mL de Clone II Fetal, num tubo cónico de 50 mL. O colagénio de tendão de cauda de rato de Tipo I (1,46 mL) a 4,11 mg/mL foi diluído com 1,882 mL de H₂O estéril e 2,658 mL de ácido acético a 0,05%. Os fibroblastos dérmicos humanos normais foram recolhidos da cultura e ressuspensos, a uma densidade celular de 10⁶ e 10⁴ células/mL. 0,815 mL da mistura contendo meio foram combinados com 2,619 mL de colagénio diluído e 34 µL de fibroblastos a 10⁴ células/mL. 116,5 µL desta mistura foram aliquotados em insertos de cultura de tecidos (25 dos quais estão numa placa de Petri) e deixados gelificar, durante 15 minutos, a 37 °C. 0,815 mL adicionais da mistura contendo meio foram combinados com outros 2,619 mL de colagénio diluído e 137 µL de fibroblastos a 10⁶ células/mL. 116,5 µL desta mistura foram aliquotados nos insertos de cultura de tecidos por cima do gel anterior e deixados gelificar, durante 30 minutos.

A placa de Petri foi, depois, inundada com 20 mL de meio FM e incubada durante 5 dias. O FM foi, depois, removido e o líquido aspirado das superfícies dos equivalentes dérmicos. As células NIKS foram recolhidas utilizando processos correntes, ressuspensas a 2,345x10⁶ células/mL em meio de plaqueamento (PM). 150 µL desta suspensão foram colocados na superfície de cada equivalente dérmico e deixados incubar durante 2 horas. Os equivalentes dérmicos semeados foram, depois, inundados com

20 mL de PM. Após dois dias, as culturas submersas foram realimentadas com PM.

Após mais dois dias, o meio foi removido da placa de Petri, assim como da superfície das culturas. As culturas foram levantadas à interface de ar e alimentadas com, aproximadamente, 30 mL de PM suplementado para soro a 2%, de 2 em 2 dias. As culturas foram analisadas 14 dias depois de serem semeadas. Nenhuma das culturas tinha cobertura epidérmica completa do equivalente dérmico. Deste modo, eram inadequadas para aplicação comercial.

Exemplo 10

Este exemplo descreve a preparação de equivalentes dérmicos utilizando colagénio a 3 mg/mL. 4,785 mL de meio F12 de Ham, preparado a concentração de 10X, foram misturados com 0,946 mL de H₂O estéril, 0,473 mL de mistura de Penicilina/Estreptomicina e 4,785 mL de Clone II Fetal, num tubo cónico de 50 mL. 4,6 mL desta mistura de meio foram misturados com 0,242 mL de H₂O estéril e 0,289 mL de NaOH a 1 N. 0,92 mL da mistura foram misturados com 3 mL de colagénio de tendão de cauda de rato de Tipo I, a 3,11 mg/mL. A este foram adicionados 186 µL de uma suspensão de fibroblastos dérmicos humanos a 10⁶ células/mL. 100 µL desta mistura foram colocados em insertos de MILLICELL (1 cm de diam.) e deixados gelificar durante 30 minutos. A placa de Petri foi, depois, inundada com 20 mL de meio FM e deixada incubar. Após 5 dias, o FM foi removido e o líquido aspirado das superfícies dos equivalentes dérmicos. As células NIKS™ foram recolhidas utilizando processos correntes, ressuspensas a 2,345x10⁶ células/mL em meio de plaqueamento (PM). 150 µL desta

suspensão foram colocados na superfície de cada derme e deixados incubar durante 2 horas. Os equivalentes dérmicos semeados foram, depois, inundados com 20 mL de PM. Após mais dois dias, o meio foi removido da placa de Petri (incluindo a superfície das culturas) e as culturas foram levantadas à interface de ar e alimentadas com, aproximadamente, 30 mL de meio de estratificação, de 2 em 2 dias. As culturas foram analisadas 14 dias depois de serem semeadas. Na conclusão do crescimento de cultura, a totalidade das culturas tinha cobertura completa do equivalente dérmico com epiderme e eram lisas e secas em aparência. Deste modo, eram altamente aceitáveis para aplicação comercial.

Exemplo 11

Este exemplo demonstra os efeitos benéficos de pré-levantamento do equivalente dérmico antes da sementeira com queratinócitos. 1,31 mL de meio F12 de Ham, preparado a concentração de 110X, foram misturados com 0,328 mL de H₂O estéril, 0,148 mL de mistura de Penicilina/Estreptomicina e 1,472 mL de Clone II Fetal, num tubo cónico de 50 mL e 1,63 mL (~metade) foram divididos num segundo tubo. 2,92 mL de colagénio de tendão de cauda de rato (4,11 mg/mL) foram misturados com 3,764 mL de H₂O estéril e 5,316 mL de ácido acético a 0,05%, para dar colagénio a 1 mg/mL em ácido acético a 0,05%. 5,24 mL do colagénio diluído foram adicionados a 1,63 mL da mistura de meios. 74 µL de células de fibroblastos dérmicos humanos recolhidas com protocolos correntes, a uma densidade celular de 10⁴ células/mL, foram adicionados e suavemente misturados. 116,5 µL desta mistura foram aliquotados em insertos de cultura de tecidos (25 para uma placa de Petri) e deixados gelificar,

durante 15 minutos, a 37 °C. Outros 5,24 mL de colagénio foram adicionados aos segundos 1,63 mL de mistura de meios, juntamente com 274 µL de fibroblastos a 10^6 células/mL. 116,5 µL foram adicionados a cada inserto por cima da primeira camada de colagénio gelificado. Este foi deixado gelificar, durante 30 minutos, a 37 °C. As placas de Petri foram, depois, inundadas com 20 mL de FM, de modo a que os equivalentes dérmicos pudessem amadurecer submersos em meio. Após quatro dias, o meio foi removido da placa de Petri (incluindo da superfície das culturas) e as culturas foram levantadas à interface de ar e alimentadas com, aproximadamente, 30 mL de FM. As culturas foram deixadas na incubadora neste estado, de um dia para o outro. Depois, foram semeadas com 150 µL de queratinócitos de NIKS recolhidos da cultura de monocamada utilizando protocolos correntes, a uma densidade celular de $2,345 \times 10^6$ células/mL. Após sementeira, as culturas foram alimentadas com PM e devolvidas à incubadora. Dois dias mais tarde, as culturas foram alimentadas com SMA e, de dois em dois dias a seguir, as culturas foram alimentadas com SMB, durante um total de oito alimentações. Na conclusão do crescimento de cultura, a totalidade das culturas tinha cobertura completa do equivalente dérmico com epiderme e eram lisas e secas em aparência. A histologia revelou que as amostras pré-levantadas tinham espessuras aproximadamente iguais de derme e epiderme e todas as camadas estratificadas estavam presentes na epiderme.

Exemplo 12

Este exemplo descreve o efeito de pré-levantamento para toda a vida do equivalente dérmico. As culturas foram preparadas exactamente como na experiência bem-sucedida listada acima, com

a exceção de que nunca foram submersas. Os géis foram vertidos com os insertos de MILLICELL levantados à interface de ar e todas as sementeiras e alimentações subsequentes ocorreram com as culturas levantadas. Na conclusão do crescimento de cultura, uma em dez das culturas tinha cobertura completa do equivalente dérmico com epiderme. Este efeito é aparentemente devido em parte à fraca aderência do equivalente dérmico ao fundo do inserto de MILLICELL, visto que, na maioria das amostras, o equivalente dérmico se tinha descolado dos lados. A histologia indicou que a espessura de camada dérmica e epidérmica era altamente variável. Do mesmo modo, a estratificação epidérmica variou entre bem diferenciada e apenas cobertura de monocamada que era inaceitável para utilização comercial.

Exemplo 13

Este exemplo descreve a optimização de meios isentos de soro que suportam estratificação total de queratinócitos em cultura organotípica que também resultam em equivalentes de pele com função de barreira melhorada.

As culturas organotípicas foram iniciadas pelo plaqueamento de 350000 células NIKS num equivalente dérmico anteriormente preparado num inserto de MILLICELL de 10 mm. Os meios utilizados para completar esta etapa eram constituídos por um meio de base (3:1 de mistura de meio F12 de Ham/meio de Eagle modificado por Dulbecco (DME), suplementado com adenina a 24 µg/mL, toxina da cólera a 8,3 ng/mL, insulina a 5 µg/mL, hidrocortisona a 0,4 µg/mL, penicilina a 100 unidades/mL, estreptomicina a 100 µg/mL, com concentração de cálcio final ajustada para

1,88 mM através da adição de CaCl_2) suplementado com Clone II Fetal a 0,2%.

Dois dias pós-plaqueamento, foram proporcionados meios frescos às culturas organotípicas para manutenção do crescimento. Foram proporcionados às culturas meios de base suplementados com Clone II Fetal a 0,2% ou meios de base com constituintes adicionais (albumina de soro bovino a 1 mg/mL de baixa endotoxina, factor de crescimento epidérmico a 1 ng/mL, isoproterenol a 1 μM , carnitina a 10 μM , serina a 10 μM , ácido oleico a 25 μM , ácido linoleico a 15 μM , ácido araquidónico a 7 μM , α -tocoferol a 1 μM e ácido ascórbico a 0,050 mg/mL) suplementado com Clone II Fetal a 0,2%.

Quatro dias pós-plaqueamento e durante o resto da experiência, foram proporcionadas às culturas organotípicas uma de seis formulações de meios. As culturas que tinham recebido anteriormente meios de base suplementados com Clone II Fetal a 0,2%, foram abastecidas com meios de base sem suplementação de Clone II Fetal ou meios de base suplementados com Clone II Fetal a 0,2%, ou meios de base suplementados com Clone II Fetal a 2%. As culturas que tinham anteriormente recebido meios de base com constituintes adicionais suplementados com Clone II Fetal a 0,2%, foram abastecidas com meios de base com constituintes adicionais sem suplementação de Clone II Fetal, ou meios de base com constituintes adicionais suplementados com Clone II Fetal a 0,2%, ou meios de base com constituintes adicionais suplementados com Clone II Fetal a 2%.

Três critérios foram utilizados para avaliar o impacto das formulações de meios. A inspecção visual foi utilizada para determinar a extensão de cobertura de superfície celular

contígua. As leituras de medidor de impedância foram utilizadas para medir a função de barreira resultante das culturas. A viabilidade de tecido pós-exposição a SDS a 0,1% foi utilizada como uma avaliação prática da função de barreira. Para todos os critérios, as culturas organotípicas mantidas em meios de base com constituintes adicionais tiveram um melhor desempenho do que os meios de base sem constituintes adicionais. A exclusão de soro não impediu o desempenho das culturas organotípicas, desde que os constituintes adicionais fossem proporcionados.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Comer, Allen

Allen-Hoffmann, Lynn

Hoffmann, Michael

<120> Substitutos de Pele Melhorados e suas Utilizações

<130> Strata-07021 -

<160> 3

<170> PatentIn versão 3.0

<210> 1

<211> 2908

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 1

gacgccaaaga gagcgagcgc ggctccgggc gcgcggggag cagaggcggt ggcgggcggc	60
gggggacccc ggagccgcgc agtgccctc cccgcccctc cagccccca cccaggaacc	120
cgcccgtgac ccgcgcccac ggccgcgcgc acccggtaca gtcccagga ctccgcaccc	180
cgcgccaccg tccagctcgc agttccgcgc caccgaggcc attctcacct ggcggcgccg	240
cccgccaccg cccggaccac agccccgcgc ccgcccagag ccacagtggc cgcgacaacg	300
gtgggggaca ctgctgagtc caagagcgtg cagcctggcc atcggacctt cttatctgcc	360
ttgctgattg tctatcttta taagagttta caacttttct aagaattttt gtatacaaag	420
gaactttttt taaagacatc gccggtttat attgaatcca aagaagaagg atctcgggca	480
atctgggggt tttggtttga ggttttgttt ctaaagtttt taatcttcgt tgactttggg	540
gctcaggtag ccctctctct tcttcggact ccggaggacc ttctgggccc ccacattaat	600
gaggcagcca cctggcgagt ctgacatggc tgtcagcgac gctctgctcc cgtccttctc	660

cacgttcgcg tccggccccg cggaaggga gaagacactg cgtccagcag gtgccccgac	720
taaccgttgg cgtgaggaac tctctcacat gaagcgactt cccccacttc ccggccgccc	780
ctacgacctg gcggcgacgg tggccacaga cctggagagt ggcgagctg gtgcagcttg	840
cagcagtaac aaccggccc tctagcccg gagggagacc gaggagttca acgacctcct	900
ggacctagac tttatccttt ccaactcgct aaccaccag gaatcgggtg ccgccaccgt	960
gaccacctcg gcgtcagctt catcctcgtc ttccccggcg agcagcggcc ctgccagcgc	1020
gccctccacc tgcagcttca gctatccgat ccgggcccgg ggtgaccgg gcgtggctgc	1080
cagaaacaca ggtggagggc tctctacag ccgagaatct gcgccacctc ccacggcccc	1140
cttcaacctg ggggacatca atgacgtgag cccctcgggc ggcttcgtgg ctgagctcct	1200
gcggccggag ttggaccag tatacattcc gccacagcag cctcagccgc cagggtgggg	1260
gctgatgggc aagtttgtgc tgaaggcgtc tctgaccacc cctggcagcg agtacagcag	1320
cccttcggtc atcagtgtta gcaaaggaag ccagacggc agccaccccg tggtagtggc	1380
gccctacagc ggtggccccg cgcgcagtgc cccaagatt aagcaagagg cggccccgtc	1440
ctgcacggtc agccggtccc tagaggcca tttgagcgt ggaccccagc tcagcaacgg	1500
ccacggccc aacacacag acttccccct gggcgggcag ctccccacca ggactacccc	1560
tacactgagt cccgaggaac tgctgaacag cagggaactgt caccctggcc tgcctcttcc	1620
cccaggatcc catccccatc cgggggcca ctacctcct ttctgccag accagatgca	1680
gtcacaagtc ccctctctcc attatcaaga gctcatgcca ccgggttcct gcctgccaga	1740
ggagcccaag ccaaaggagg gaagaaggc gtggccccg aaaagaacag ccaccacac	1800
ttgtgactat gcaggctgtg gcaaaacct taccaagagt tctcatctca aggcacacct	1860
gcgaactcac acaggcgaga aaccttacca ctgtgactgg gacggctgtg ggtggaaatt	1920
cggccgctcc gatgaactga ccaggcacta ccgcaaacac acagggcacc ggccctttca	1980
gtgccagaag tgtgacagg ccttttccag gtcggaccac cttgccttac acatgaagag	2040
gcacttttaa atcccacgta gtggatgtga ccacactgc caggagagag agttcagtat	2100
ttttttttct aacctttcac actgtcttcc cacgagggga ggagcccagc tggcaagcgc	2160
tacaatcatg gtcaagttcc cagcaagtca gcttgtgaat ggataatcag gagaaggaa	2220
gagtccaaga gacaaaacag aaatactaaa aacaaacaaa caaaaaaca aacaaaaaaa	2280
ccaagaaaaa aaaatcacag aacagatggg gtctgatact ggatggatct tctatcattc	2340
caataccaaa tccaacttga acatgcccgg acttacaaaa tgccaagggg tgactggaag	2400
tttgtggata tcagggtata cactaaatca gtgagcttgg ggggaggga gaccaggatt	2460

cccttgaatt gtgtttcgat gatgcaatac acacgtaaag atcaccttgt atgctctttg	2520
ccttcttaaa aaaaaaagc cattattgtg tcggaggaag aggaagcgat tcagggtacag	2580
aacatgttct aacagcctaa atgatgggtgc ttggtgagtt gtggtcctaa aggtaccaa	2640
cgggggagcc aaagtctctc aactgctgca tacttttgac aaggaaaatc tagttttgtc	2700
ttccgatcta cattgatgac ctaagccagg taaataagcc tggtttattt ctgtaacatt	2760
tttatgcaga cagtctgtta tgcactgtgg ttccagatgt gcaataattt gtacaatgg	2820
ttattcccaa gtatgccttt aagcagaaca aatgtgtttt tctatatagt tccttgcctt	2880
aataaatatg taatataaat ttaacca	2908

<210> 2

<211> 2639

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

tcgaggcgac cgcgacagtg gtgggggacg ctgctgagtg gaagagagcg cagcccggcc	60
accggaccta cttactcgcc ttgctgattg tctatttttg cgtttacaac ttttctaaga	120
acttttgtat acaaaggaac tttttaaaaa agacgcttcc aagttatatt taatccaaag	180
aagaaggatc tcggccaatt tggggttttg ggttttggtc tcgtttcttc tcttcgttga	240
ctttggggtt caggtgcccc agctgcttcg ggctgccgag gacctctctg gccccacat	300
taatgaggca gccacctggc gagtctgaca tggctgtcag cgacgcgctg ctcccatctt	360
tctccacgtt cgcgtctggc ccggcgggaa gggagaagac actgcgtcaa gcagggtgcc	420
cgaataaccg ctggcgggag gagctctccc acatgaagcg acttccccca gtgcttcccg	480
gccgcccta tgacctggcg gcggcgaccg tggccacaga cctggagagc ggccggagccg	540
gtgcggcttg cggcggtagc aacctggcgc ccctacctcg gagagagacc gaggagttca	600
acgatctcct ggacctggac ttattctctc ccaattegct gacctatcct ccggagtcag	660
tggccgccac cgtgtcctcg tcagcgtcag cctcctcttc gtcgtcgccg tcgagcagcg	720
gccctgccag cgcgccctcc acctgcagct tcacctatcc gatccgggcc gggaacgacc	780
cgggcgtggc gccgggcggc acgggcggag gcctcctcta tggcaggag tccgctcccc	840
ctccgaacgc tcccttcaac ctggcggaca tcaacgacgt gagccctcct ggccggcttcg	900
tggccgagct cctgcggcca gaattggacc cgggtgtacat tccgccgcag cagccgcagc	960
cgccagggtg cgggctgatg ggcaagttcg tgctgaaggc gtcgctgagc gccctggca	1020

gcgagtacgg cagcccgtcg gtcattcagcg tcagcaaagg cagccctgac ggcagccacc	1080
cgggtggtggt ggcgccctac aacggcgggc cgccgcgcac gtgccccaaag atcaagcagg	1140
aggcgggtctc ttctgtgcacc cacttgggcg ctggaccccc tctcagcaat ggccaccggc	1200
cggctgcaca cgacttcccc ctggggcggc agctccccag caggactacc ccgaccctgg	1260
gtcttgagga agtgctgagc agcagggact gtcaccctgc cctgcgcgtt cctcccggt	1320
tccatcccca cccggggccc aattacccat ccttcctgcc cgatcagatg cagccgcaag	1380
tcgcccgct ccattaccaa gagctcatgc caccgggttc ctgcatgcca gaggagccca	1440
agccaaagag gggaagacga tcgtggcccc ggaaaaggac cgccaccac acttgtgatt	1500
acgcgggctg cggcaaaacc tacacaaaga gttcccatct caaggcacac ctgccaaccc	1560
acacaggtga gaaaccttac cactgtgact gggacggctg tggatggaaa ttgcgccgt	1620
cagatgaact gaccaggcac taccgtaaac acacggggca ccgccggttc cagtgcctaa	1680
aatgcgaccg agcattttcc aggtcggacc acctgcctt acacatgaag aggcattttt	1740
aaatcccaga cagtggatat gaccacact gccagaagag aattcagtat tttttacttt	1800
tcacactgtc ttcccgatga gggaaggagc ccagccagaa agcactacaa tcatggtcaa	1860
gttcccaact gagtcatctt gtgagtggat aatcaggaaa aatgaggaat ccaaaagaca	1920
aaaatcaaag aacagatggg gtctgtgact ggatcttcta tcattccaat tctaaatccg	1980
acttgaatat tcctggactt acaaaatgcc aagggggtga ctggaagttg tggatatcag	2040
ggtataaatt atatccgtga gttgggggag ggaagaccag aattcccttg aattgtgtat	2100
tgatgcaata taagcataaa agatcacctt gtattctctt taccttctaa aagccattat	2160
tatgatgtta gaagaagagg aagaaattca ggtacagaaa acatgtttta atagcctaaa	2220
tgatggtgct tggtagtct tggttctaaa ggtaccaaac aaggaagcca aagttttcaa	2280
actgctgcat actttgacaa ggaaaatcta tatttgtctt ccgatcaaca tttatgacct	2340
aagtcaggta atatacctgg tttacttctt tagcattttt atgcagacag tctgttatgc	2400
actgtgggtt cagatgtgca ataatttgta caatggttta tcccaagta tgccttaagc	2460
agaacaaatg tgtttttcta tatagttcct tgccttaata aatatgtaat ataaatttaa	2520
gcaaacgtct attttgtata tttgtaaact acaaagtaaa atgaacattt tgtggagttt	2580
gtattttgca tactcaaggt gagaattaag ttttaaataa acctataata ttttatctg	2639

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> sintético

<400> 3

gagaaggagg cgtggccaac

20

Lisboa, 10 de Março de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo uma cultura humana derivada *in vitro* de queratinócitos que se estratificou em epitélios escamosos (equivalente de pele), o referido equivalente de pele tendo uma capacitância eléctrica de superfície desde 40 a 240 pF, medida como a diferença na leitura ao longo de um intervalo de 10 segundos e em que o teor combinado de ceramidas 5, 6, e 7 no referido equivalente de pele é de 20 a 50% do teor de ceramida total, em que os referidos queratinócitos são Células de Queratinócitos Imortalizadas Quase Diplóides.
2. Composição da reivindicação 1, tendo o referido equivalente de pele humana uma capacitância eléctrica de superfície desde 80 a cerca de 120 pF.
3. Composição da reivindicação 1 ou 2, em que o teor de ceramida 2 no referido equivalente de pele é de cerca de 10 a 40% do teor de ceramida total.
4. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, compreendendo as referidas Células de Queratinócitos Imortalizadas Quase Diplóides uma construção de gene repórter responsivo e irritante.

5. Composição de qualquer uma das reivindicações 1 a 4 para utilização na oclusão de feridas e/ou tratamento de queimaduras de um doente sofrendo de uma ferida.

Lisboa, 10 de Março de 2014

**Figura 1. Sequência de ARNm de Klf4 de murganho
(SEQ ID Nº: 1)**

```

1 gacgccaaga gacgagcgc ggctccgggc gcgcggggag cagaggcggg ggccgggggc
61 gggggcaccg ggagccgcgc agtgcgccctc cccgccccctc cagcccccca cccaggaacc
121 cggccgtgac ccgcgcccat ggccgcgcgc acccggtaca gtccccagga ctccgcaccg
181 cgcgccaccg tccagctcgc agttccgcgc caccgcggcc attctcacct ggccggccgc
241 cccgccaccg cccggaccac agcccccgcg ccgcgcagag ccacagtggc cgcgacaaag
301 gtgggggaca ctgctgagtc caagagcgtg cagcctggcc atcggacctt cttatctgcc
361 ttgctgattg tctattttta taagagttaa caacttttct aagaattttt gtatacaaa
421 gaactttttt taaagacatc gccggtttat attgaatoca aagaagaagg atctcgggca
481 atctgggggt tttggtttga ggttttgttt ctaaagttaa taatctctgt tgactttggg
541 gctcaggtac cctctctctt tcttcggact ccggaggacc ttctggggcc ccacattaat
601 gaggcagcca cctggcgagt ctgacatggc tgtcagcgac gctctgtctc cgtccttctc
661 caggttcgcg tccggcccgg cgggaaggga gaagacactg cgtccagcag gtgccccgac
721 taaccggttg cgtgaggaac tctctcacat gaagcgactt cccccattc ccggccgccc
781 ctacgacctg gcggcgacgg tggccacaga cctggagagt ggccgagctg gtgcagcttg
841 cagcagtaac aaccggcccc tcttagcccc gagggagacc gaggagttaa acgacctcct
901 ggacctagac ttatcccttt ccaactcgtt aaccaccagc gaatcggtag ccgccaccgt
961 gaccacctcg gcgtcagctt catcctcgtc tccccggcg agcagcggcc ctgccagcgc
1021 gccctccacc tgcagcttca gctatccgat ccgggcgggg ggtgaccggg gcgtggctgc
1081 cagaaacaca ggtggagggc tctctacag ccgagaatct gcgccacctc ccacggcccc
1141 cttcaacctg ggggacatca atgacgtgag cccctcgggc ggcttcgttg ctgagctcct
1201 gggcccgag gtggaccagc tatacatctc gccacagcag cctcagccgc caggtggggg
1261 gctgatgggc aagtttgtgc tgaaggcgtc tctgaccacc cctggcagcg agtacagcag
1321 cccttcgggt atcagtggtt gcaaagggaag ccagacggcc agccaccggc tggtagtggt
1381 gccctacagc ggtggcccgc cgcgcagtgt ccccaagatt aagcaagagg cgggtccgtc
1441 ctgcacggtc agcgggtccc tagagggcca tttgagcgct ggaccccagc tcagcaacgg
1501 ccaccggccc aacacacacg acttccccct gggggcgagc ctccccacca ggactacccc
1561 tacactgagt ccgaggaac tgcgtaacag cagggactgt caccctggc tgcctcttcc
1621 ccaggattc catcccatc cgggggcca ctaccctct ttcctgcag accagatgca
1681 gtcacaagtc ccctctctcc attatcaaga gctcatgcca ccgggttcc tgcctgcaga
1741 ggagcccaag ccaaagaggg gaagaagggt gtggcccgcc aaaagaacag ccaccacac
1801 ttgtgactat gcaggctgtg gcaaaacctt taccaagagt tctcatctca aggcacacct
1861 gcgaactcac acaggcgaga aaccttacca ctgtgactgg gacggctgtg ggtggaaatt
1921 cgcgcgctcc gatgaactga ccaggcacta ccgcaaacac acagggcacc ggccctttca
1981 gtgccagaag tgtgacaggg ccttttccag gtccgaccac cttgccttac acatgaagag
2041 gcacttttaa atcccacgta gtggatgtga cccacactgc caggagagag agttcagtat
2101 ttttttttct aacctttcac actgtcttcc cagcagggga ggagcccagc tggcaagcgc
2161 tacaatcatg gtcaagttcc cagcaagtca gcttgtgaat ggataatcag gagaaaggaa
2221 gagtccaaga gacaaaacag aaatactaaa aacaaaacaa caaaaaaaca aacaaaaaaa
2281 ccaagaaaaa aaaatcacag aacagatggg gtctgatact ggatggatct tctatcattc
2341 caataccaaa tccaacttga acatgcccgg acttacaaaa tgccaagggg tgactggaag
2401 tttgtggata tcagggtata cactaaatca gtgagcttgg ggggagggaa gaccaggatt
2461 cccttgaatt gtgtttcgat gatgcaatac acacgtaaag atcaccttgt atgctctttg
2521 ccttcttaaa aaaaaaaagc cattattgtg tcggaggaag aggaagcgat tcaggtagag
2581 aacatgttct aacagcctaa atgatggtgc ttggtgagtt gtggtcctaa aggtacaaaa
2641 cgggggagcc aaagtctctc aactgctgca tacttttgac aaggaaaaatc tagttttgtc
2701 ttccgatcta cattgatgac ctaagccagg taaataagcc tggtttattt ctgtaacatt
2761 tttatgcaga cagtctgtta tgcactgtgg tttcagatgt gcaataatct gtacaatggt
2821 ttattcccaa gtatgccttt aagcagaaca aatgtgtttt tctatatagt tccttgcctt
2881 aataaatatg taatataaat ttaaccca

```

**Figura 2. Sequência de ADNc para GKlf4 Humana
(SEQ ID Nº: 2)**

```

1tcgagggcgac cgcgacagtg gtgggggacg ctgctgagtg gaagagagcg cagccccggc
61 accggaccta cttactcgcc ttgctgattg tctatttttg cgtttacaac ttttctaaga
121 acttttgtat acaaaggaac tttttaaaaa agaagccttc aagttatatt taatccaaag
181 aagaaggatc tcggccaatt tggggttttg ggttttggct tcgtttcttc tcttcgttga
241 ctttggggtt caggtgcccc agctgcttcg ggctgcccag gaccttcttg gccccacat
301 taatgaggca gccacctggc gagtctgaca tggctgtcag cgacgcgctg ctcccatctt
361 tctccacgtt cgcgtctggc ccggcgggaa gggagaagac actgctcaa gcaggtgccc
421 cgaataacog ctggcgggag gagctctccc acatgaagcg acttccccca gtgcttcccg
481 gccgcccta tgacctggcg gcggcgaccg tggccacaga cctggagagc ggcggagccg
541 gtgcggcttg cggcggtagc aacctggcgc ccctacctcg gagagagac gaggagttca
601 acgatctcct ggacctggac ttattctctt ccaattcgct gacctctct cgggagtcag
661 tggccgccac cgtgtctctg tcagcgtcag cctcctcttc gtgctcgccg tcgagcagcg
721 gccctgccag cgcgccttcc acctgcagct tcacctatcc gatccgggcc gggaacgacc
781 cgggcgtggc gccgggcggc acgggcggag gcctcctcta tggcaggag tccgctcccc
841 ctccgaogcg tcccttcaac ctggcggaca tcaacgacgt gagccctcg ggcggcttcg
901 tggccgagct cctgcggcca gaattggacc cgggtgtacat tccgcgcgag cagccgcagc
961 cgccaggtgg cgggctgatg ggcaagtctg tgctgaaggg gtgctgagc gccctggca
1021 gcgagtacgg cagcccgctg gtcatcagcg tcagcaaagg cagccctgac ggcagccacc
1081 cgggtggtgg ggccgcttac aacggcgggc cgcgcgcac gtgccccaa atcaagcagg
1141 aggcggcttc ttctgtgacc cacttgggcg ctggaccccc tctcagcaat ggcaccggc
1201 cggctgcaca cgacttcccc ctggggcggc agctccccag caggactacc ccgacctgg
1261 gtcttgagga agtgtgagc agcagggact gtcacctgc cctgcgctt cctcccgct
1321 tccatcccc cccggggccc aattacccat ccttctctgc cgtacagatg cagccgcaag
1381 tcccgccgct ccattacca gagctcatgc caccgggttc ctgcatgcca gaggagccca
1441 agccaaagag gggaagacga tcgtggcccc ggaaaaggac cgcacccac acttggtatt
1501 acgcgggctg cggcaaaacc tacacaaaga gttcccatct caaggcacac ctgcgaaccc
1561 acacaggtga gaaaccttac cactgtgact gggacggctg tggatggaaa ttgcgccgt
1621 cagatgaact gaccaggcac taccgtaaac acacggggca ccgcccgctc cagtgcctaa
1681 aatgcgaccg agcattttcc aggtcggacc acctcgctt acacatgaag aggcattttt
1741 aaatcccaga cagtggatat gacccacact gccagaagag aattcagtat tttttacttt
1801 tcacactgtc ttcccgatga gggaaggagc ccagccagaa agcactacaa tcatggtcaa
1861 gttcccaact gagtcatctt gtgagtggt aatcaggaaa aatgaggaat ccaaaagaca
1921 aaaatcaaag aacagatggg gtctgtgact ggatcttcta tcattccaat tctaaatccg
1981 acttgaatat tcttggaact acaaaatgcc aagggggtga ctggaagtgt tggatatcag
2041 ggtataaatt atatccgtga gttgggggag ggaagaccag aattcccttg aattgtgtat
2101 tgatgcaata taagcataaa agatcacctt gtatttctct taccttctaa aagccattat
2161 tatgatgtta gaagaagagg aagaaattca ggtacagaaa acatgtttta atagcctaaa
2221 tgatggtgct tgggtgagct tgggtctaaa ggtaccaaaac aagggaagcca aagttttcaa
2281 actgctgcat actttgacaa ggaaaatcta tatttgtctt ccgatcaaca tttatgacct
2341 aagtcaggta atatacctgg ttacttctt tagcattttt atgcagacag tctgttatgc
2401 actgtggttt cagatgtgca ataatttgta caatgggtta ttccaagta tgcttaagc
2461 agaacaaatg tgtttttcta tatagttcct tgccttaata aatatgtaat ataaatttaa
2521 gcaaacgtct attttgata tttgtaaact acaaagtaaa atgaacattt tgtggagttt
2581 gtattttgca tactcaaggt gagaattaag ttttaataaa acctataata ttttatctg

```

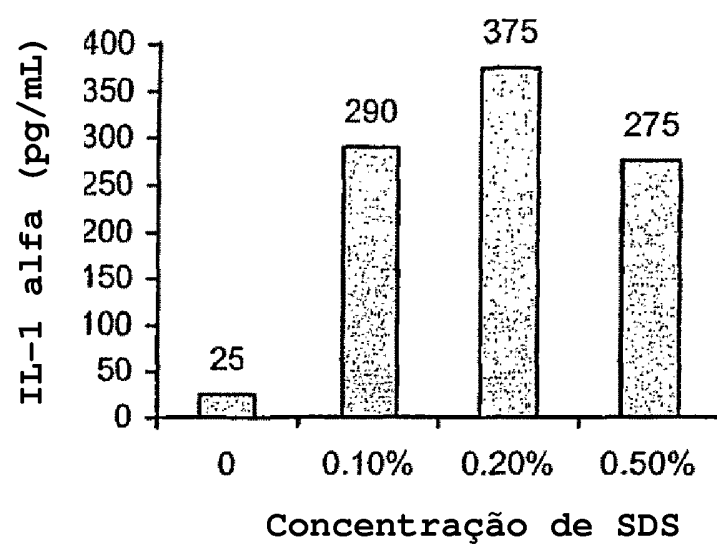
Figura 3

Figura 4

