



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 655**

51 Int. Cl.:
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06256402 .6**

96 Fecha de presentación : **15.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1811019**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.07.2007**

54 Título: **Siembra de células sobre soportes porosos.**

30 Prioridad: **16.12.2005 US 303244**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2011

73 Titular/es: **LIFESCAN, Inc.**
1000 Gibraltar Drive
Milpitas, California 95035, US

72 Inventor/es: **Rezania, Alireza y**
Ghabrial, Ragae

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 655 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Siembra de células sobre soportes porosos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para sembrar células en un soporte.

5 Antecedentes de la invención

El trasplante de tejido en un animal, tal como, por ejemplo, células madre, células cultivadas *in vitro*, o células primarias aisladas, típicamente implica la introducción directa de material celular en el receptor, ya sea en el torrente sanguíneo o directamente en un tejido. Sin embargo, estos procedimientos están asociados con complicaciones significativas, tales como la trombosis, que reduce la supervivencia celular.

10 La ingeniería de tejidos puede proporcionar una solución a este problema proporcionando un soporte tridimensional que actúa como sustrato para la adhesión celular. Se ha demostrado previamente que células sembradas en un soporte diseñado apropiadamente podrían recrear el microentorno *in vivo*, facilitando de este modo las interacciones célula-célula y la expresión de funciones diferenciadas. Para construir dichas estructuras complejas, la eficacia del procedimiento de siembra de células puede ser importante para el rendimiento global de la construcción de tejido
15 diseñada.

Antes de la presente invención, la siembra de células en soportes ha implicado el simple depósito de células en el soporte dependiendo de la difusión pasiva de las células en el soporte. Estos enfoques no fueron muy satisfactorios (Vacanti y col., "Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices", J. Pediatr. Surg. 23(1 Pt 2): 3-9, 1988). Se han desarrollado varios enfoques diferentes para potenciar la eficacia de la siembra de células. Por ejemplo, se han usado matraces en agitación en la siembra de condrocitos en soportes de ácido poliglicólico (Vunjak-Novakovic y col., "Dynamic cell seeding of polymer supports for cartilage tissue engineering", Biotechnol. Prog. 14(2):193-202, 1998). El procedimiento implicaba suspender los soportes mediante agujas en una suspensión celular y mezclar con una barra de agitación magnética a 50 rpm. El procedimiento requería un largo tiempo para completarse, variando de varias horas a un día.
20

Otro enfoque para la siembra de células es el uso de centrifugación, que produce un estrés mínimo en las células sembradas y potencia la eficacia de siembra. Se desarrolló un procedimiento de siembra de células por Yang y col. (J. Biomed. Mater. Res. 55(3): 379-86, 2001), mencionado como Inmovilización Celular por Centrifugación (ICC). Se sembraron hepatocitos en cubos de poli(vinil formal) poroso hidrófilo. Tanto los cubos como los hepatocitos se suspendieron en medio en un tubo de centrifugación y se expusieron a etapas alternas de centrifugación y resuspensión. El procedimiento produjo una eficacia de siembra del 40% y requirió una gran cantidad de hepatocitos (2-8 x 10⁷ células). Dar y col. (Biotechnol. Bioeng. 80(3): 305-12, 2002) utilizaron un enfoque más controlado en la siembra de células mediante centrifugación. Se sembraron cardiomiocitos en un soporte de alginato hidrófilo colocando el soporte en un pocillo de una placa de 96 pocillos y pipeteando 10 µl de suspensión celular en el mismo. La placa después se colocó en un rotor tipo portaplacas y se centrifugó durante 6 minutos a 1000 x g, 4°C. Se informó de una eficacia de siembra del 80-90% en un soporte de alginato, que disminuyó al 60% cuando se usaron densidades de siembra mayores por soporte. Los procedimientos de centrifugación descritos anteriormente han tenido algún éxito pero tienen limitaciones. Una cuestión vital en el procedimiento es la porosidad del soporte. La fuerza centrífuga presiona la suspensión celular a través del soporte donde el material celular queda atrapado dentro de los poros del soporte. Si la porosidad es demasiado grande, el material celular pasa todo a través del soporte hasta la parte inferior de la cámara de centrifugación conduciendo a una bajada en la eficacia de siembra. Por otro lado, la disminución de la porosidad del soporte para tener en cuenta esta cuestión puede tener un efecto negativo sobre la supervivencia del material celular sembrado. Una alta porosidad es esencial para permitir la difusión de oxígeno y nutrientes.
25
30
35
40

La siembra de células en un soporte hidrófobo es habitualmente más complejo que en uno hidrófilo. Las células habitualmente se suspenden en una solución de medio de cultivo en la que el agua es el componente principal. Un soporte hidrófobo repele una suspensión celular evitando que las células se infiltren en dicho soporte. Para superar dicha barrera, se requiere una fuerza accionadora. La fuerza, independientemente de su fuente, expone las células a un componente de estrés que es dañino para las células. Por tanto, sigue existiendo una necesidad para desarrollar un procedimiento simple y reproducible para sembrar células en soportes porosos, particularmente los hidrófobos, con elevada eficacia de siembra y poca o ninguna pérdida en la viabilidad celular.
45
50

Sumario

La presente invención proporciona un procedimiento para sembrar células de cualquier tipo en un soporte. El procedimiento de la presente invención puede diseñarse para no exponer las células sembradas a ninguna fuerza que pueda afectar a la viabilidad o función celular. El procedimiento puede no ejercer fuerzas dañinas sobre las células para guiar uniformemente la siembra de las células en el soporte, consiguiendo una elevada eficacia de siembra y ninguna pérdida significativa en la viabilidad celular. El procedimiento de la presente invención también puede ser más eficaz para reducir las cuestiones de contaminación. El uso de una fuerza para facilitar la siembra de
55

las células en un soporte puede implicar el procesamiento adicional de las células, que a su vez aumenta las oportunidades de contaminación.

La presente descripción también describe un kit para sembrar células en un soporte biocompatible.

Breve descripción de las figuras

5 **Figura 1:** Micrografía electrónica de un soporte no tejido de la presente invención. La matriz del soporte está compuesta por fibras hechas de vicryl®.

Figura 2: Micrografía electrónica de un soporte compuesto de la presente invención. La matriz del soporte está compuesta por fibras hechas de vicryl®. Se incorpora un componente de espuma en el componente fibroso.

10 **Figura 3:** Una imagen de microscopía confocal de células madre mesenquimáticas en un soporte no tejido. Las células se tiñeron con un colorante vital, donde las células vivas se tiñen de verde y las células muertas se tiñen de rojo.

Descripción detallada

El término "soporte", como se usa en este documento, se refiere a una arquitectura tridimensional que es capaz de soportar células sobre la superficie o dentro de la arquitectura.

15 El término "poroso", como se usa en este documento, se refiere a una pluralidad de aberturas en el soporte que pueden conducir o no a la interconexión de los espacios intersticiales dentro del soporte, que posibilita la distribución uniforme de nutrientes y células dentro del soporte.

El término "biocompatible" se refiere a la capacidad del soporte de residir dentro de un mamífero de modo que no induzca efectos tóxicos o indeseables en ese mamífero.

20 Por "biodegradable" o "absorbible" se entiende que el dispositivo puede degradarse o absorberse gradualmente por procesos biológicos naturales después de que el dispositivo se haya suministrado en un sitio de interés dentro de un mamífero.

El término "matriz", como se usa en este documento, se refiere al material que comprende el componente sólido de un soporte.

25 El término "soporte hidrófobo", como se usa en este documento, se refiere a un soporte compuesto por un polímero que no se humedece fácilmente cuando está en contacto con agua. Por ejemplo, uno con un ángulo de contacto con el agua por encima de 10°, más específicamente uno con un ángulo de contacto por encima de 45°, se consideraría hidrófobo.

30 El término "soporte hidrófilo", como se usa en este documento, se refiere a un soporte compuesto por un polímero que se humedece fácilmente cuando está en contacto con agua. Por ejemplo, uno con un ángulo de contacto con el agua por debajo de 45°, y más específicamente uno con un ángulo de contacto por debajo de 10°, se consideraría hidrófilo.

35 El procedimiento de siembra de la presente invención puede aplicarse a cualquier tipo celular. El término "células", como se usa en este documento, se refiere a células aisladas, líneas celulares (incluyendo células diseñadas *in vitro*), cualquier preparación de tejido vivo, incluyendo explantes de tejido primario y preparaciones de los mismos.

El término "medio", como se usa en este documento, se refiere a un líquido que se usa para hidratar los soportes de la presente invención. El medio es no tóxico para las células y es compatible con el líquido que se usa para introducir el material celular en el soporte.

40 El término "medio de cultivo", como se usa en este documento, se refiere a un líquido que se usa para introducir células en los soportes de la presente invención. El medio de cultivo puede ser o no el que se usa para propagar las células *in vitro*. El medio de cultivo es no tóxico para las células y es compatible con el líquido que se emplea para hidratar los soportes de la presente invención.

SIEMBRA DE CÉLULAS EN SOPORTES

45 El procedimiento de la presente invención puede diseñarse específicamente para no exponer las células sembradas a ninguna fuerza que pueda afectar a la viabilidad o función celular. En general, se pone en contacto un soporte con líquido, y el líquido fluye en el interior de los poros internos del soporte hasta que están completa o casi completamente llenos con líquido. En un aspecto de la invención, el líquido es medio. El grado al que se llena el soporte dependerá del tipo de soporte y la cantidad y tipo de células a atrapar en el mismo. Después se aplica fuerza para retirar una cantidad deseada de líquido para crear suficiente volumen, o huecos, en el soporte para la
50 introducción posterior de material celular.

Por ejemplo, el soporte después puede colocarse sobre un filtro en una cámara de centrifugación y centrifugarse para retirar algo, sino todo, del líquido que se ha introducido en el mismo. El soporte después se retira del filtro y se coloca en una placa de cultivo celular. Después se usa un cierto volumen de líquido cargado con células para rellenar el volumen potencial o los huecos parciales que se crearon mediante la centrifugación. En un aspecto de la invención, el líquido es medio de cultivo. Como el soporte no está completamente seco, acepta fácilmente el líquido que acoge las células en el interior del soporte sin ninguna pérdida de células o ninguna exposición a fuerzas externas.

Aunque la centrifugación es un procedimiento para aplicar fuerza para retirar líquido, pueden usarse otros tipos de fuerza para conseguir el mismo efecto. Por ejemplo, es fácilmente concebible que también pueda usarse la aplicación de una fuerza compresiva o la aplicación de un vacío para retirar la cantidad deseada de líquido. También es posible, para un soporte que tiene espacios intersticiales interconectados, usar una jeringa para retirar la cantidad deseada de líquido. Dichos soportes podrían ser, por ejemplo, los descritos en el documento US20040062753 A1 y la patente de Estados Unidos N° 4.557.264.

La cantidad de fuerza a usar para retirar líquido que se ha introducido en el soporte puede controlarse para permitir la retirada de la cantidad deseada de líquido. En el caso de una centrífuga, el tiempo y la velocidad de rotación de la centrífuga pueden variarse a través de experimentación normal para conseguir dicha retirada. En el caso en que se emplee fuerza compresiva o vacío, dicha retirada puede, de nuevo, obtenerse retirando una cantidad igual o en exceso de volumen de material celular que tiene que introducirse posteriormente en el soporte.

Empleando el procedimiento de la presente invención, la siembra de células en un soporte poroso se consigue con una alta eficacia de siembra sin pérdida significativa de viabilidad celular. La eficacia de siembra se considera elevada si es mayor del 10%, preferiblemente mayor del 20%, preferiblemente mayor del 30%, preferiblemente mayor del 40%, preferiblemente mayor del 50%, preferiblemente mayor del 60%, preferiblemente mayor del 70%, preferiblemente mayor del 80%, preferiblemente mayor del 90%. Una pérdida de viabilidad de más del 70% se considera significativa. Preferiblemente, la pérdida de viabilidad es menor del 10%, más preferiblemente, menor del 5%.

En un aspecto de la presente invención, los soportes se colocan en medio de cultivo hasta que el soporte llega a estar completamente infiltrado con el líquido y no quedan espacios de aire en los poros. Los soportes impregnados después se colocan en una cámara de filtración que se ajusta en una placa, recipiente o dispositivo que a su vez se ajusta en un rotor en una cámara de centrifugación. Después se usan fuerzas de centrifugación para retirar una parte del medio de cultivo del soporte, creando espacios vacíos y/o hundiéndose flexible y reversiblemente la matriz del soporte dentro de los poros o el espacio intersticial del soporte. Las células se introducen en el soporte suspendiendo primero las células en un volumen de medio de cultivo que es igual o menor al volumen de medio de cultivo que se desplaza del soporte por centrifugación. El soporte después se pone en contacto con la suspensión celular. En esta realización, el soporte puede ser estéril, y el procedimiento puede realizarse en condiciones estériles. Los soportes de la presente invención pueden esterilizarse por cualquier procedimiento conocido en la técnica.

Las células deben reconstituirse en volumen de líquido menor o equivalente al volumen retirado del soporte mediante la aplicación de fuerza. Si la cantidad de líquido cargado de células añadido es mayor que el líquido retirado, el exceso de líquido cargado de células puede no introducirse satisfactoriamente en el soporte, lo que puede provocar una caída en la eficacia de siembra. La aplicación precisa de fuerzas es deseable para retirar parcialmente el líquido del soporte, sin permitir que se seque. En otra realización, los procedimientos descritos en este documento también se usan para sembrar células en soportes con células ya incorporadas.

En otro aspecto, la presente descripción también proporciona un kit para sembrar células en un soporte. El kit contiene un soporte, medio, y células en el medio.

EL SOPORTE

Un especialista en la técnica apreciará que la selección de un material adecuado para formar el soporte para el dispositivo de la presente invención depende de varios factores. Los factores más relevantes en la selección del material apropiado incluyen la cinética de bioabsorción (o biodegradación); el rendimiento mecánico *in vivo*; la respuesta celular al material en términos de adhesión, proliferación, migración y diferenciación celular; y la biocompatibilidad. Otros factores relevantes, que en algún grado dictan el comportamiento *in vitro* e *in vivo* del material, incluyen la composición química, la distribución espacial de los constituyentes, el peso molecular, el grado de cristalinidad, y el contenido de monómeros en el caso de materiales poliméricos. Las propiedades superficiales de los materiales también pueden optimizarse para conseguir la hidrofiliabilidad deseada. Los procedimientos que se usan para construir los polímeros usados en el dispositivo de la presente invención se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos US20040062753 A1 y la patente de Estados Unidos N° 4.557.264 expedida el 10 de diciembre de 1985 transferida a Ethicon, Inc.

Los soportes de la presente invención preferiblemente incluyen poros o huecos de interconexión, que facilitan la incorporación de células en el soporte, así como el transporte de nutrientes y/o la expansión de las células dentro del

soporte. Los poros interconectados preferiblemente varían en tamaño de aproximadamente 50 a 1000 micrómetros, preferiblemente de 50 a 400 micrómetros, y preferiblemente constituyen de aproximadamente el 70 al 95% del volumen total del soporte. El intervalo del tamaño de poro en el soporte puede manipularse modificando las etapas del procedimiento durante la preparación del soporte.

5 Los soportes adecuados para su uso en la presente invención pueden ser un soporte altamente fibroso o no tejido, como se ilustra en la Figura 1, o un soporte compuesto que está típicamente compuesto por un componente no tejido y un componente de espuma como se ilustra en la Figura 2. En una realización preferida, los soportes de la presente invención tienen al menos un agente farmacéutico incorporado en el material que forma el soporte.

10 Con un soporte compuesto, las fibras encapsuladas por una matriz porosa pueden organizarse en una forma seleccionada entre hebras, hilos, redes, cordones, fieltros y esteras no tejidas. Preferiblemente, las fibras están en forma de una estera fibrosa no tejida. Pueden usarse técnicas de fabricación en húmedo o en seco conocidas para preparar las esteras no tejidas fibrosas del soporte compuesto de la presente invención ("Non-woven textiles", por Radko Krcma, Textile Trade Press, Manchester, UK, 1967).

15 En un aspecto de la presente invención, el soporte es un soporte no tejido hecho de un copolímero 90/10 de PGA/PLA, vendido con el nombre comercial vicryl® (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Un soporte basado en vicryl® no tejido es altamente fibroso con un intervalo de porosidad del 70-95%. Preferiblemente, el soporte basado en vicryl® no tejido tiene una porosidad del 90%.

20 En un aspecto alternativo, el soporte usado en el procedimiento de la presente invención es un soporte no tejido hecho de un copolímero 95/5 de PLA/PGA, vendido con el nombre comercial panacryl® (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Un soporte basado en panacryl® no tejido es altamente fibroso con un intervalo de porosidad del 70-95%. Preferiblemente, el soporte basado en panacryl® no tejido tiene una porosidad del 90%.

25 En otro aspecto de la presente invención, el soporte es un soporte no tejido hecho de un homopolímero 100% de polidioxanona, vendido con el nombre comercial PDS II® (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Un soporte basado en PDS II® no tejido es altamente fibroso con un intervalo de porosidad del 70-95%. Preferiblemente, el soporte basado en PDS II® no tejido tiene una porosidad del 90%.

Los especialistas en la técnica aprecian que los soportes no tejidos también pueden prepararse mezclando diferentes proporciones de las fibras PDS II®, panacryl®, y vicryl®.

30 En un aspecto alternativo, la presente invención emplea un soporte compuesto que comprende un componente no tejido y un componente de espuma poroso que rodea las fibras del componente no tejido. El componente de espuma preferido se prepara a partir de PGA/PCL 65/35, PLA/PCL 60/40, o mezclas de los mismos. Un soporte compuesto para su uso en la presente invención debe tener un intervalo de porosidad del 70-95%. Preferiblemente, el soporte compuesto tiene una porosidad del 90%.

35 Como alternativa, el soporte es un soporte de espuma altamente poroso, preparado a partir de copolímero PGA/PCL 65/35, copolímero PLA/PCL 60/40, o mezclas de los mismos. Un soporte de espuma para su uso en la presente invención debe tener un intervalo de porosidad del 70-95%. Preferiblemente, el soporte de espuma tiene una porosidad del 90%.

LAS CÉLULAS

40 Las células útiles para su administración en esta invención incluyen células autólogas, alogénicas, o xenogénicas. En el caso de que se pretenda la invención para tratar la diabetes, las células pueden ser células madre, células precursoras/progenitoras pancreáticas, células productoras de insulina modificadas por ingeniería genética, células de los islotes o productoras de insulina primarias o expandidas parcial o completamente diferenciadas.

45 Dicho tratamiento también puede usarse para otros tipos de terapia celular incluyendo, por ejemplo, hepatocitos para el tratamiento de fallo hepático, células cromafines para el dolor crónico, células que producen factores de coagulación para la hemofilia, y células que producen factores de crecimiento nervioso para enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Parkinson o Alzheimer, así como fibroblastos, miofibroblastos, células cardiovasculares, células neurales y células precursoras neurales.

50 Otras células que pueden ser terapéuticamente eficaces para diferentes aplicaciones incluyen, aunque sin limitación, células progenitoras, células precursoras, células madre, células de médula ósea, células sanguíneas de cordón umbilical, angioblastos, células endoteliales, osteoblastos, células de músculo liso, células renales, células amnióticas y células placentarias post-parto. En una realización adicional de la presente invención, las células pueden modificarse por ingeniería genética para producir una proteína terapéutica, o para regular negativamente la respuesta inmune del receptor.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de los principios y la práctica de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Siembra de células en un soporte no tejido de vicryl®.

- 5 Se preparó una lámina biodegradable no tejida de aproximadamente 2 mm de grosor a partir de fibras de vicryl® (PGA/PLA 90/10). Los soportes después se perforaron desde la lámina usando un punzón de biopsia con un diámetro de 8 mm. El soporte después se esterilizó mediante el procedimiento de esterilización con óxido de etileno. Los soportes estériles después se sumergieron en medio DMEM estéril en un tubo Falcon de 50 ml (50 cc) estéril. Una vez que los soportes estuvieron completamente impregnados, se colocaron en un pocillo de malla en un tubo cónico de 50 ml (Falcon BD). El pocillo después se cubrió con una cubierta de placa de cultivo tisular estéril. El cultivo después se transfirió a una cámara de centrifugación (Allegra 6R).
- 10 Se aplicaron varias velocidades de centrifugación (300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1500 rpm) durante periodos de 5 minutos para determinar los parámetros de centrifugación óptimos. La centrifugación durante 5 minutos a una velocidad de 400-600 rpm proporcionó suficiente fuerza para retirar aproximadamente el 75% del medio del soporte. Esta etapa conduce a la recreación de un espacio apropiado dentro del soporte sin secarlo completamente. La centrifugación del soporte durante un periodo de 5 minutos a una velocidad mayor de 1000 rpm condujo a un grado
- 15 de sequedad en el que el soporte llega a ser demasiado hidrófobo para permitir la incorporación de células.
- Después de la centrifugación, los soportes se transfirieron cada uno a un pocillo diferente de una placa de cultivo tisular de 6 pocillos estéril (Falcon BD). Se suspendió 1 millón de células madre mesenquimáticas en 60 µl de medio y se pipetearon en cada soporte. Las células penetraron instantáneamente en el soporte para llenar el espacio que se creó mediante la centrifugación. Cuando se usó un volumen mayor (aproximadamente 100 µl), el exceso de medio fluía del soporte sobre la superficie de la placa transportando un porcentaje significativo de las células.
- 20 Después de la incorporación de las células, los soportes se colocaron en una cámara humidificada, que después se colocó en un incubador a 37°C durante 3 horas para permitir la adhesión celular a las fibras del soporte. Los soportes después se movieron a nuevos pocillos, que contenían cada uno 10 µl de medio. Las células restantes sobre la superficie de cada pocillo se contaron del siguiente modo; primero se añadieron tres mililitros de medio a cada pocillo y se aplastaron hacia arriba y abajo para recoger cualquier célula recién adherida. Después se recogió el medio de cada pocillo y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Después se retiró el medio y se resuspendió cada sedimento celular y se determinó la cantidad de células usando un hemocitómetro. Después se determinó la eficacia de siembra en base a la cantidad total de células sembradas y la cantidad de células que quedaban sobre la superficie de cada pocillo. La eficacia de siembra promedio para cinco soportes fue de aproximadamente el 95%.
- 25 Cuando se usó un volumen de 100 µl para resuspender el sedimento celular, la eficacia de siembra bajaba hasta el 60%.
- 30

Ejemplo 2: Ensayo de la viabilidad y distribución celular

- 35 Se sembraron células madre mesenquimáticas (Cambrex) en un soporte de vicryl® no tejido como se ha descrito en el ejemplo anterior. El soporte después se colocó en DMEM con FBS al 10% y se incubó a 37°C y CO₂ al 5% durante 2 días. El soporte después se lavó cuidadosamente con PBS para retirar el exceso de medio y se sumergió en una solución de un kit de viabilidad para vivas-muertas (sondas moleculares) durante 10 minutos. Después de eso, se tomó una imagen tridimensional mediante un microscopio confocal que mostraba una sección transversal de 10 micrómetros dentro del soporte. Las células vivas aparecían en verde y las muertas aparecían en rojo (Figura 3).
- 40 Aunque los diversos aspectos de la invención se han ilustrado anteriormente por referencia a los ejemplos y realizaciones preferidas, se apreciará que el alcance de la invención se define no por la anterior descripción, sino por las siguientes reivindicaciones apropiadamente interpretadas según los principios de la ley de patentes.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para sembrar una pluralidad de células en un soporte poroso que comprende las etapas de:
 - (a) introducir un líquido en el soporte, y
 - (b) retirar parcialmente el líquido del soporte por la aplicación de una fuerza centrífuga, una fuerza compresiva o un vacío, creando de este modo huecos en el soporte, y
 - (c) poner en contacto el soporte de la etapa (b) con una pluralidad de células, y
 - (d) permitir que las células entren en el soporte sin exposición a una fuerza externa que pueda afectar a la viabilidad celular.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el líquido es medio.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de células es una suspensión.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la suspensión contiene medio.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los poros son entre aproximadamente 50 y 1000 μm .
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el soporte es hidrófobo.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células se reconstituyen en un volumen de líquido que es menor o igual al volumen de líquido que se retira.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la pluralidad de células se selecciona entre el grupo que consiste en células madre, células precursoras/progenitoras pancreáticas, células productoras de insulina modificadas por ingeniería genética, islotes pancreáticos primarios, hepatocitos, células cromafines, células precursoras neurales, células progenitoras, células precursoras, células de médula ósea, células sanguíneas de cordón umbilical, angioblastos, células endoteliales, osteoblastos, células de músculo liso, células renales, fibroblastos, miofibroblastos, células cardiovasculares, células neurales, células precursoras neurales, células amnióticas y células placentarias post-parto.

FIG. 1

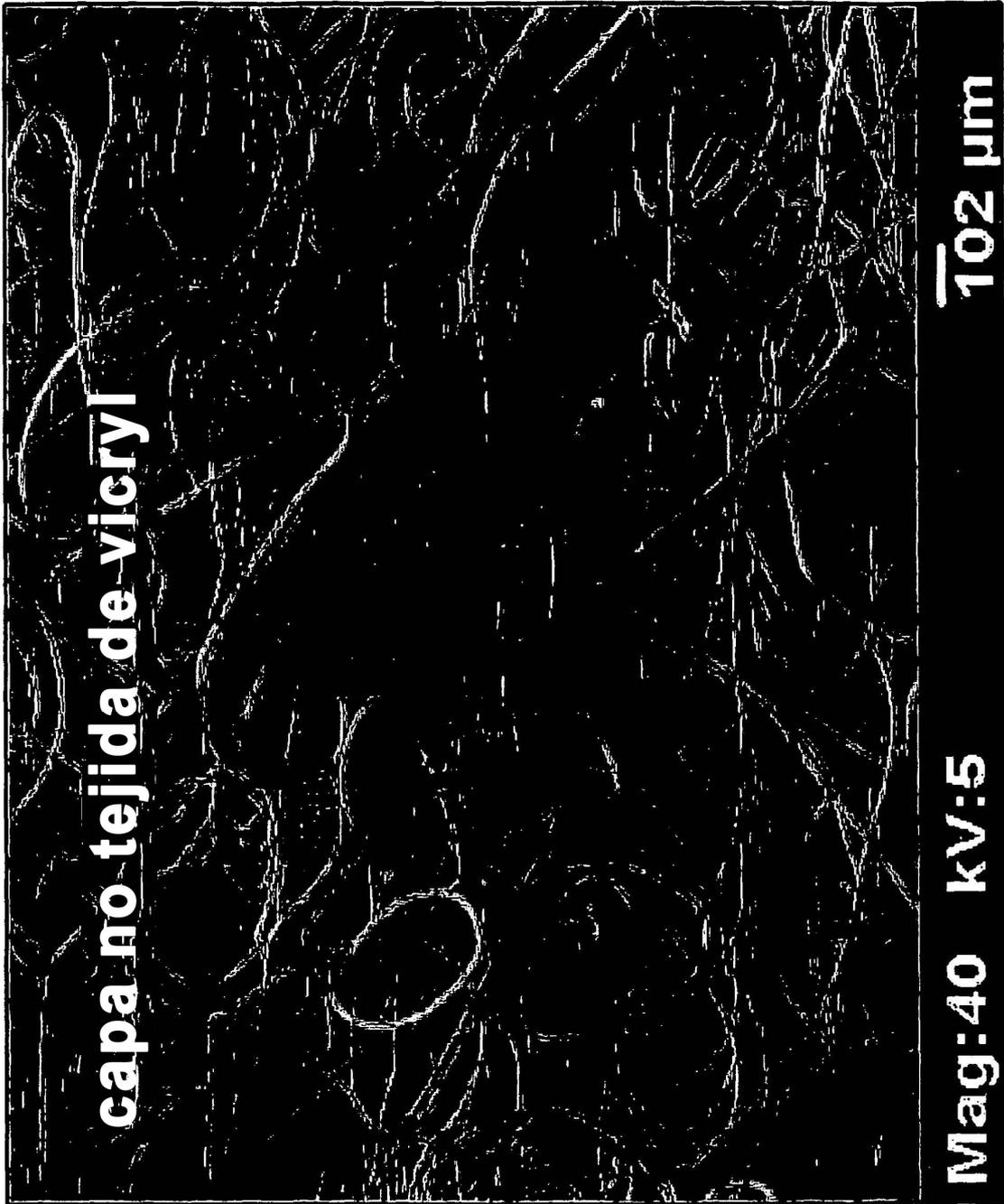


FIG. 2

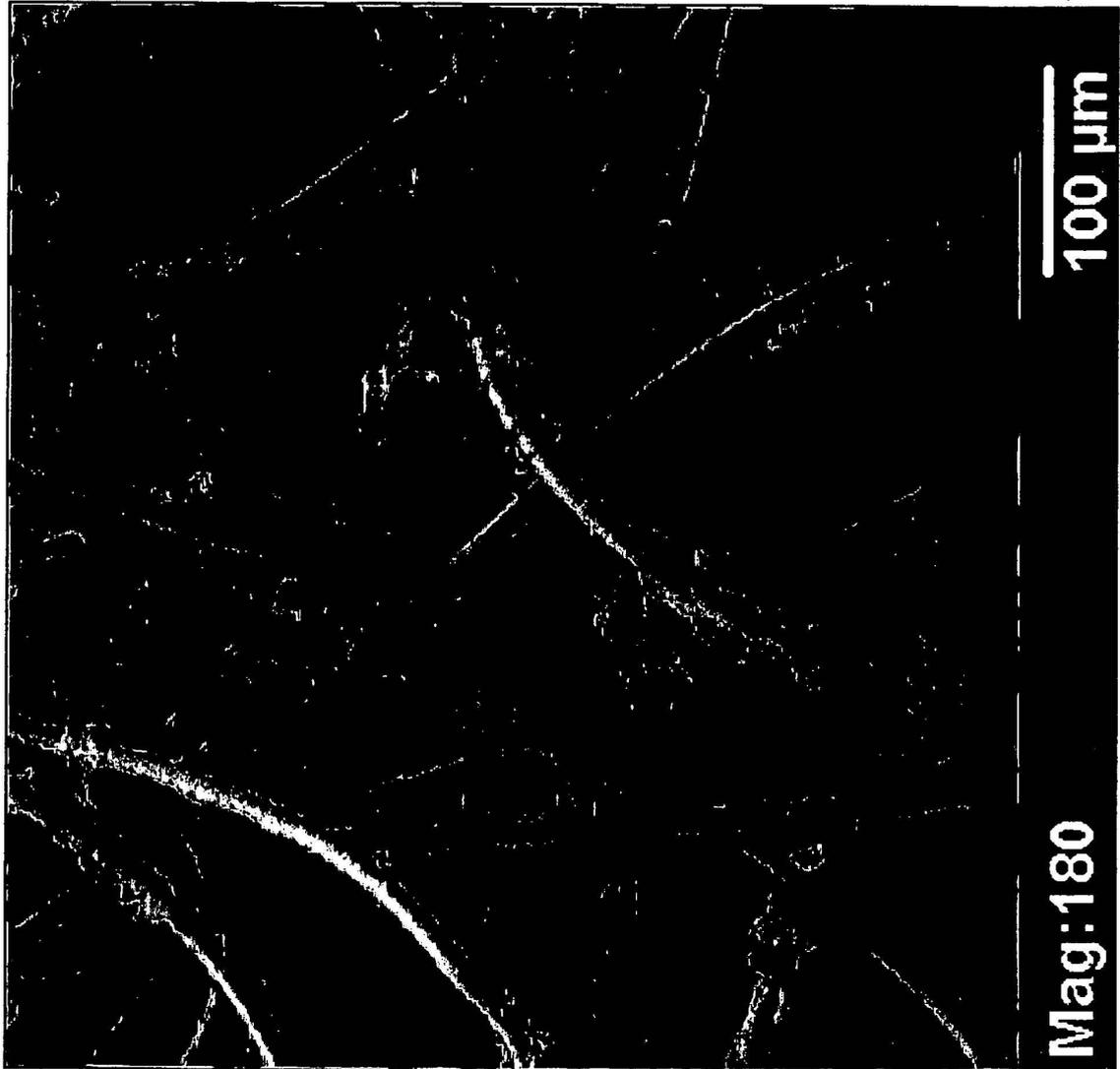


FIG. 3

