

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 088**

51 Int. Cl.:
C12M 3/00 (2006.01)
C12M 1/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03785710 .9**
96 Fecha de presentación: **02.12.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1594949**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2005**

54 Título: **PROCEDIMIENTO Y DISPOSITIVO PARA LA FORMACIÓN DE MATERIAL CELULAR BIOLÓGICO.**

30 Prioridad:
21.02.2003 DE 10307487

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.01.2012

73 Titular/es:
**Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V.
Hansastraße 27c
80686 München, DE**

72 Inventor/es:
**FUHR, Günter, R. y
ZIMMERMANN, Heiko**

74 Agente: **Espiell Volart, Eduardo María**

ES 2 373 088 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

La invención se refiere a procedimientos para la formación, en particular para la conformación y/o deposición, de un material celular con una pluralidad de células biológicas, en particular a procedimientos para la adaptación o modificación de una topografía superficial de un material celular y a procedimientos para la estructuración geométrica del material celular, como, por ejemplo, procedimientos para la denominada ingeniería tisular. La invención también se refiere a herramientas de manipulación para la realización de estos procedimientos, en especial a sustratos para material celular tal como, por ejemplo, cultivos celulares o tejido, y a herramientas de conformación con las que se puedan modificar la forma geométrica y/o la expansión del material celular. La invención se refiere asimismo a nuevas aplicaciones de los procedimientos y herramientas de manipulación mencionados.

En la medicina, la biotecnología y la bioquímica, los objetivos principales del estudio o la manipulación de células biológicas, especialmente en relación con la terapia celular médica y la ingeniería tisular (Tissue Engineering), consisten en proporcionar formaciones de células o grupos de células con una disposición geométrica predeterminada de las células individuales. Por ejemplo, la forma de un material celular que se implanta en un organismo debe adaptarse lo mejor posible a las condiciones geométricas existentes en el lugar de implante. Por la práctica es sabido que la forma del material de implante se puede ajustar mediante una separación mecánica adecuada (corte) de un cultivo celular. Esto, sin embargo, resulta desventajoso puesto que el daño de las células o del material celular puede tener efectos no deseados en la regeneración del tejido después del implante. En numerosos experimentos conocidos en la práctica no se produjo la regeneración o neoformación deseada de un tipo de célula o tejido, sino, por ejemplo, la inducción de tumores. Se parte de la base de que la inducción de tumores es trasladada al lugar del implante en forma de una proliferación celular incontrolada de células por influencias físicas, químicas o mecánicas ajenas. Estas influencias no se pueden ajustar de forma reproducible y ni siquiera registrar con las técnicas convencionales.

Otro ejemplo para la conformación de material celular se encuentra en el estudio de principios activos (ensayo de principios activos farmacológicos) en modelos tisulares. Como modelos tisulares se utilizan con preferencia los denominados esferoides, que se producen como estructura esférica mediante el crecimiento de material celular en forma de capas sobre un núcleo interior de células. Un inconveniente de los modelos tisulares convencionales reside en su tamaño limitado. Por ejemplo, hasta ahora sólo se pueden utilizar esferoides con un diámetro de hasta aproximadamente 150 µm. Cuando los diámetros son mayores, surgen problemas en el aporte de nutrientes a las células interiores. La vitalidad de las células interiores se restringe y se puede producir la muerte de las células desde el interior hacia el exterior.

Otro problema aún no resuelto de la ingeniería tisular radica en la generación de materiales compuestos estructurados formados por materiales celulares de distintos tipos celulares o por células biológicas y materiales sintéticos. Un inconveniente reside en que actualmente las formaciones de compuestos están relacionadas con lesiones mecánicas de las células o del material celular.

Los problemas mencionados de la terapia celular y los resultados de la ingeniería tisular, en parte poco satisfactorios hasta la fecha, constituyen en la actualidad las limitaciones y los retrasos más importantes con vistas a una amplia aplicación de estos procedimientos en la biotecnología y la medicina.

La patente US-A-5108926 da a conocer una disposición selectiva de células biológicas para un cultivo tisular sobre un sustrato con un procedimiento de impresión que trabaja a modo de una impresora de inyección de tinta.

El objetivo de la invención es proporcionar procedimientos mejorados para la formación de material celular con una disposición geométrica predeterminada de las células individuales, con los que se superen los inconvenientes de los procedimientos convencionales y que sean especialmente adecuados para conformar y/o generar material celular sin dañar células individuales. El objetivo de la invención también es proporcionar unas herramientas de manipulación mejoradas para la realización de este tipo de procedimientos, con las que se superen los inconvenientes de las técnicas celulares o tisulares convencionales. Otro objetivo más de la invención es señalar nuevas aplicaciones de la conformación, el cultivo o la generación de material celular.

Estos objetivos se alcanzan con los procedimientos y las herramientas de manipulación con las características de las reivindicaciones 1 ó 20. Los modos de realización y las aplicaciones ventajosas de la invención se deducen de las reivindicaciones dependientes.

En lo que al procedimiento se refiere, la invención se basa en la enseñanza técnica general de que la disposición geométrica de las células en el material celular se ajusta con una herramienta de manipulación que está en contacto, al menos parcialmente, con un material celular que se ha de manipular modificando de manera predeterminada la geometría superficial de la herramienta de manipulación. La geometría superficial se modifica de acuerdo con la invención respecto a al menos una de las características de área, orientación en relación con un sistema de referencia fijo, forma superficial y estructura superficial. Ventajosamente, las células del material celular que están en

5 contacto con la superficie de la herramienta siguen el movimiento de la superficie, permaneciendo inalterado el estado físico y químico de las células durante el movimiento de la superficie. La modificación geométrica de la superficie de la herramienta provoca exclusivamente una reorganización de las células, especialmente un desplazamiento o traslado de células sin causar daño, en la que, si bien se deforman células en contacto con el cuerpo de la herramienta o células situadas a más profundidad en el material celular o se altera su posición espacial, éstas no liberan señales químicas en forma de sustancias mensajeras o secreciones de sustancias.

10 Por material celular se entiende en este caso en general una acumulación de células que están en contacto con su entorno mediante contactos de adhesión (uniones químicas macromoleculares, ningún enlace de van der Waals). El material celular es, por ejemplo, una agrupación o aglomeración de células individuales, un tejido (agrupación de células con el mismo tipo de diferenciación) o un órgano. La agrupación no fluida de células individuales puede contener componentes sintéticos adicionales, por ejemplo un material matricial sintético. Con formación de material celular se designa en este caso en general una modificación de la forma, la densidad, el tamaño y/o la estructura del material celular.

15 La herramienta de manipulación es, en general, un elemento extraño u objeto formado por un material delimitable respecto al material celular, con una superficie sólida cuyas propiedades geométricas son variables al menos en zonas parciales. La herramienta de manipulación puede presentar, por ejemplo, un sustrato para un cultivo celular, una sonda en el material celular o un punzón para la conformación. La herramienta de manipulación se puede ajustar de tal manera que las propiedades geométricas de su superficie se alteren respecto a al menos una de las características antes mencionadas. La velocidad de ajuste se denomina velocidad de avance.

20 La invención se basa especialmente en las reflexiones siguientes de los autores. En primer lugar, se ha reconocido que las reacciones manifestadas hasta ahora de diversas formas, por ejemplo, por las células en un tejido o en una agrupación de células se deben a que mediante la introducción de una herramienta se dañan o destruyen células en el material celular presente, provocando de este modo efectos de herida. Cuando se hieren células o tejidos, se generan señales químicas (emisión de sustancias mensajeras moleculares) o procesos mediados por células, como, por ejemplo, una migración de fibroblastos, una secreción de fibronectina o similares. La reacción de las células dañadas influye en la actividad de las células o de las sustancias adicionales. Por ejemplo, el comportamiento de las células troncales en el entorno de células dañadas es distinto del de las células troncales en un material celular intacto. En segundo lugar, los autores han constatado que, en contra de los conceptos actuales, incluso las células unidas por adhesión se pueden desplazar espacialmente sin sufrir daños. Esto permite la introducción mecánica de herramientas en el material celular. Las células permanecen intactas durante el movimiento de la superficie de la herramienta en y/o a través del material celular si la velocidad de avance es lo suficientemente baja como para que los contactos adhesivos entre las células se pierdan de manera natural, es decir, sin alterar o destruir las células, y se puedan formar de nuevo en el entorno cambiante.

35 El ajuste geométrico de la superficie de la herramienta y, relacionado con ello, el desplazamiento o traslado de células sin dañarlas permite cumplir todos los requisitos antes mencionados. Queda excluido el daño o perjuicio del material celular. El estado físico, químico y mecánico de las células se puede caracterizar y conservar completamente. Se evitan los contactos nocivos entre células y superficies de elementos extraños y se inhiben las señales celulares producidas por contactos no deseados con superficies. El movimiento sin daño permite efectuar la manipulación de las células idealmente suave. La herramienta de manipulación se puede guiar con precisión en el material celular en una configuración determinada.

45 Según un modo de realización preferida de la invención, la herramienta de manipulación se ajusta a una velocidad de avance menor o igual a una velocidad de referencia determinada por la tasa de unión fisiológica de las células biológicas (velocidad de unión de las células durante su locomoción celular natural). La locomoción celular natural (inglés: cell locomotion) comprende el cambio de lugar de una célula completa sobre una superficie sólida o en el material celular por medio de una reorganización de los contactos adhesivos de organelos celulares (organelos membranosos, por ejemplo eversiones de membrana), como lo describen, por ejemplo, M. Abercrombie y col. en la publicación "The Locomotion Of Fibroblasts In Culture" ("Experimental Cell Research", vol. 67, 1971, pág. 359-367) y L.P. Cramer en la publicación "Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility" ("Biochem. Soc. Symp." vol. 65, 1999, pág. 173-205).

50 La velocidad de referencia fisiológica es conocida en sí (véase, por ejemplo, B.G. Fuhr y col. en "Biol. Chem.", 1998, vol. 379, pág. 1161-1173) o se puede medir en células animales o humanas. La tasa de unión que interesa se puede deducir, por ejemplo, midiendo la dinámica de los patrones de adhesión de células aisladas sobre superficies artificiales.

55 Con la velocidad de avance se designa aquí en general la velocidad a la que se mueve la superficie de la herramienta de manipulación en relación con el material celular. Esta velocidad se puede referir a la superficie total en sí, a determinados elementos de forma que representan partes de la superficie o a una ampliación de la superficie. En el

5 caso de una expansión de la superficie la velocidad de avance designa, por ejemplo, la velocidad relativa de puntos de referencia cuando la superficie se amplía. Ajustando la velocidad de avance, la herramienta de manipulación puede mover o reorganizar ventajosamente las células en una agrupación natural sin dañarlas. La velocidad de avance se adapta a la locomoción celular que se produce permanentemente en el tejido. Se sabe, por ejemplo, que determinados tipos de células inmunes (por ejemplo los macrófagos) se mueven a través de tejido denso desplazando las células presentes. Los autores han constatado que, sorprendentemente, si se ajusta la velocidad de avance mencionada, este movimiento de desplazamiento también se puede realizar con herramientas que son bastante más grandes que las células inmunes y que poseen dimensiones macroscópicas comprendidas en el intervalo de submilímetros a centímetros. Durante el movimiento o la generación de la superficie de la herramienta se rompen continuamente enlaces macromoleculares (por ejemplo, macromoléculas unidas a la membrana de la familia de las integrinas y caterinas) entre las células que se vuelven a formar, por ejemplo, con la superficie de la sonda.

10 Se obtienen ventajas especiales de la invención cuando la velocidad de avance de la herramienta de manipulación se elige en un intervalo de velocidad de 0,1 $\mu\text{m/h}$ a 1 mm/h, preferentemente en el intervalo de 1 $\mu\text{m/h}$ a 500 $\mu\text{m/h}$. En este intervalo de velocidad se encuentran las tasas de unión para la formación y disociación de enlaces macromoleculares que son mediados típicamente por macromoléculas unidas a la membrana de la familia de las integrinas y caterinas. Los intervalos de velocidad preferidos equivalen a las velocidades de la locomoción celular de, en particular, fibroblastos, macrófagos, linfocitos, condrocitos o células tumorales. El ajuste de una velocidad de avance tan baja permite ajustar ventajosamente la posición y forma de la superficie de la herramienta con una elevada precisión de aproximadamente +/- 1 μm o incluso menos. Las velocidades de avance en los intervalos mencionados equivalen a las velocidades de locomoción endógenas activas de las células en y sobre tejido. El movimiento de la sonda provoca así una permanente adición y reorganización de las células en el entorno inmediato de la superficie de la herramienta, pudiendo fomentar una fuerza de avance que actúa permanentemente un desplazamiento de las células.

15 Si la herramienta de manipulación se expone a una fuerza de avance que actúa permanentemente, su movimiento se puede realizar a la velocidad de avance deseada, ventajosamente incluso con un gasto de energía mínimo. Esto permite usar dispositivos de ajuste de baja potencia. Si la velocidad de avance se genera mediante una fuerza de compresión mecánica, se pueden obtener ventajas en la transmisión de la fuerza de avance a la sonda. Si la fuerza de avance se genera mediante fuerzas en campos eléctricos o magnéticos, las ventajas residen en que las fuerzas de avance se pueden ejercer mediante acción a distancia.

20 Se pueden obtener ventajas especiales si el procedimiento de acuerdo con la invención se realiza con material celular que se encuentra fuera de un organismo animal o humano. El material celular se puede disponer, en condiciones de cultivo adecuadas, sobre un soporte sólido que proporciona la fuerza opuesta para ejercer la fuerza de avance. El material celular y la sonda se pueden colocar con elevada precisión.

25 De modo alternativo, el material celular se puede encontrar agrupado en un organismo vivo. La herramienta de manipulación se puede introducir en el tejido en forma de, por ejemplo, sonda, herramienta de biopsias, herramienta de inyección o herramienta de implante. Por la baja velocidad de avance, la introducción se efectúa en un estado en el que el tejido en cuestión está fijado, por ejemplo sujeto de un modo fijo a un soporte junto con la parte circundante del organismo. El uso de un anestésico resulta preferible para la inmovilización pero no es imprescindible en vista de que el procedimiento no causa lesiones.

30 Según otro modo de realización preferido de la invención, el ajuste de la herramienta de manipulación puede comprender una expansión de la superficie de la herramienta. El material celular que se ha de manipular se dispone sobre la superficie de la herramienta. El material celular constituye una capa celular cuyo grosor disminuye por la expansión de la superficie y/o en la que se forman huecos en los que la superficie de la herramienta queda al descubierto. De este modo se posibilita ventajosamente la formación de una agrupación del material celular en capas que se va ampliando por adhesión de células procedentes de un medio de cultivo adyacente. Por lo tanto, esta forma de realización de la invención puede presentar ventajas especialmente para la creación de los modelos tisulares antes mencionados para el ensayo de principios activos.

35 Según otra variante, la herramienta de manipulación se compone, al menos parcialmente, de un material elástico que forma la superficie de la herramienta que entra en contacto con las células y que se expande durante la fabricación de la herramienta de manipulación. Ventajosamente, el material elástico (por ejemplo, plástico, goma) crea una superficie cerrada y continua. De modo alternativo, la superficie ajustable se puede componer, según una segunda variante, de un material no elástico, tal como, por ejemplo, de láminas telescópicas de metal o de plástico, lo que puede suponer ventajas para la precisión de la modificación de las propiedades geométricas de la superficie.

40 Si, según otra modificación de la invención, la herramienta de manipulación presenta un cuerpo hueco que posee un espacio hueco interior con una superficie interior que se amplía al ajustar la herramienta de manipulación, se pueden obtener ventajas para la creación de modelos tisulares esferoidales. Según diferentes variantes de la invención, el material celular se puede disponer por fuera sobre el cuerpo de la herramienta hueco, sobre la superficie interior del

5 cuerpo de herramienta o sobre ambas superficies interior y exterior. Estas variantes presentan ventajas para la creación de modelos tisulares en capas compuestos por diferentes tipos celulares que pueden crecer desde el exterior o el interior sobre la superficie de la herramienta, ampliándose continuamente el área de sustrato disponible mediante el ajuste, de acuerdo con la invención, de la superficie. Ventajosamente se puede evitar un grosor de capa excesivo no deseado que podría conducir a un infra-abastecimiento de las células situadas a más profundidad, pudiéndose formar al mismo tiempo esferoides muchos más grandes que en los modelos tisulares convencionales.

La herramienta de manipulación hueca se genera preferentemente en forma de esfera con un diámetro comprendido en el intervalo de 0,01 mm a 10 cm.

10 Si, según otra variante del procedimiento de acuerdo con la invención, la formación del material celular comprende la reorganización geométrica de las células mediante el ajuste de la superficie de la herramienta y al mismo tiempo la adhesión de células procedentes de un medio circundante, se pueden obtener ventajas para la generación de cultivos celulares con un grosor máximo predeterminable. Por consiguiente, un objeto independiente de la invención es un procedimiento de cultivo celular en el que se adhieren células procedentes de un medio de cultivo a una superficie de sustrato que se va ampliando. Se pueden obtener ventajas especiales para la ingeniería tisular (Tissue Engineering) si el material celular está formado por células de diferentes tipos celulares en capas sobre o dentro del cuerpo de herramienta hueco.

20 La ampliación de la superficie de la herramienta se puede llevar a cabo ejerciendo una presión hidrostática en el interior de la herramienta de manipulación. Por ejemplo, según una variante ventajosa de la invención, la herramienta hueca constituida por un material elástico puede estar conectada con una tubería a presión (por ejemplo una tubería de líquido) a través de la cual se puede introducir a presión un líquido o un gas en el espacio interior de la herramienta. La expansión de la superficie de la herramienta se efectúa mediante el suministro de líquido o gas. La expansión con un líquido posee la ventaja de que el volumen de líquido suministrado está directamente relacionado con la ampliación de la superficie. Para la deposición antes mencionada de material celular sobre la cara interior del cuerpo hueco puede resultar ventajoso utilizar como líquido para la expansión de la superficie de la herramienta una suspensión de células que transporta las células que se han de cultivar al espacio interior.

25 Para la aplicación en la ingeniería tisular puede resultar ventajoso que la superficie del cuerpo de herramienta se componga de un material que permita un contacto electrofisiológico, un intercambio de sustancias entre el espacio interior de la herramienta y su entorno y/o contactos celulares entre los espacios interior y exterior.

30 Según otro modo de realización preferido de la invención, el cuerpo de herramienta contiene al menos un elemento de forma desplazable, en el que, cuando se ajusta el cuerpo de herramienta, el elemento de forma sobresale de la superficie de la herramienta y modifica con ello la estructura de la superficie. El al menos un elemento de forma asigna al cuerpo de herramienta la función de un punzón cuya forma de punzón se puede adaptar de forma variable a los requisitos correspondientes mediante la desplazabilidad del elemento de forma. Si se prevé una pluralidad de elementos de forma, la variabilidad aumenta ventajosamente con la configuración de la superficie del punzón.

35 Según una variante de la invención, la herramienta con el al menos un elemento de forma se puede utilizar como soporte de cultivos celulares que determina la forma del cultivo celular. De manera alternativa, la herramienta de manipulación con la superficie cuya forma viene determinada por la disposición del al menos un elemento de forma se puede colocar sobre el material celular a modo de punzón.

40 Un objeto independiente de la invención es un material celular biológico o material compuesto de células-soporte generado con el procedimiento de acuerdo con la invención, por ejemplo un esferoide de células constituido por un material celular sobre una superficie de soporte expandida.

45 En lo que al dispositivo se refiere, el objetivo antes indicado se alcanza proporcionando una herramienta de manipulación que comprende un cuerpo de herramienta con al menos una superficie cuya forma y/o tamaño es ajustable y un dispositivo de ajuste para ajustar la superficie. Ventajosamente, esta herramienta permite, en contacto con un material que se ha de manipular, que la estructura superficial se estampe sobre el material celular. Si en el dispositivo de ajuste se ha establecido para la modificación de la geometría superficial una velocidad de avance característica correspondiente a una velocidad de referencia fisiológica de células biológicas, se obtienen las ventajas antes mencionadas para una reorganización de las células sin dañarlas durante la conformación.

50 Según una variante especialmente ventajosa, la superficie de la herramienta de manipulación está dotada de una estructura o recubrimiento que fomenta la unión adhesiva de células biológicas. El material de unión constituye el cuerpo de herramienta, al menos la cara anterior del cuerpo de herramienta o un recubrimiento en al menos la cara anterior del cuerpo de herramienta. Se compone, por ejemplo, de fibronectina o colágeno. Este modo de realización de la invención puede presentar ventajas relacionadas mediante un aumento de la velocidad de unión durante el movimiento desplazante del cuerpo de herramienta en el material celular. De una manera alternativa, el material de

unión puede poseer una rugosidad con tamaños estructurales característicos comprendidos en el intervalo de sub-pm, de modo que se fomente la unión del material celular a la sonda.

La superficie de la herramienta de manipulación puede estar dotada además de una estructura o recubrimiento que bloquea la unión adhesiva de las células biológicas al menos en zonas parciales de la superficie. Como recubrimiento se prevén, por ejemplo, compuestos químicos conocidos en sí, por ejemplo silanos hidrófobos y polímeros hidrófilos. A continuación se describen más detalles y ventajas de la invención haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Muestran:

5

las figs. 1 y 2 ilustraciones de la formación y reorganización de material celular según un primer modo de realización de la invención;

10

la fig. 3 una ilustración de un movimiento de extensión radial de una herramienta de manipulación de acuerdo con la invención;

las figs. 4 y 5 una ilustración de la superficie de una herramienta con una pluralidad de elementos de forma desplazables; y

15

la fig. 6 un estampado de forma de acuerdo con la invención del material celular con una herramienta de manipulación.

20

Las figuras 1 y 2 ilustran el principio de la invención, que consiste en generar de manera predeterminada esferas huecas u otras geometrías huecas de material celular. Para ello se utiliza una herramienta de manipulación 10 con un cuerpo de herramienta 11 hueco elástico y una tubería a presión 13 por medio de la cual está conectada una fuente de presión 30 externa (solo representada en la figura 1A) con un espacio interior 31 del cuerpo de herramienta 11. La fuente de presión 30 mostrada esquemáticamente constituye un dispositivo de ajuste para ajustar la superficie 12 del cuerpo de herramienta 11. Comprende, por ejemplo, un depósito de líquido y una bomba.

25

El cuerpo de herramienta 11 forma, por ejemplo, un globo de goma que en estado relajado posee un diámetro de, por ejemplo, 0,01 mm y en estado expandido puede poseer un diámetro de hasta, por ejemplo, 100 mm. Como tubería a presión 13 se utiliza un capilar de, por ejemplo, acero o vidrio. Si el material de la herramienta 10 se compone de un material plástico elástico semipermeable (por ejemplo, una membrana de silicona), se posibilita ventajosamente la generación de gradientes de sustancias en el tejido celular.

30

Mediante la inyección de aire o de un líquido en el espacio interior 31 se puede ampliar la superficie 12 del cuerpo de herramienta 11, conservándose esencialmente la forma. La ampliación se efectúa de manera que unos puntos de referencia adyacentes sobre la superficie 12 se alejen el uno del otro a una velocidad equivalente a la velocidad de referencia fisiológica antes mencionada. De manera correspondiente, las células sobre la superficie 12 pueden seguir el movimiento de expansión sin exponerse a una destrucción mecánica no deseada. Las figuras 1A y B muestran cómo sobre el cuerpo de herramienta relajado crece primero una monocapa de células 21 procedentes de una suspensión de células 81 circundante sobre la superficie 12. Mediante la ampliación de la superficie 12 se aumenta constantemente el espacio para la ampliación de la monocapa de células 20.

35

Añadiendo más tipos celulares 22, 23 al medio exterior y/o al medio interior se pueden generar capas de células flexibles histioideas, tal como se ilustra esquemáticamente en la fig. 1C.

40

La figura 2 muestra el cultivo de material celular 20 sobre la superficie interior 14 del cuerpo hueco 11 en tres estados de expansión diferentes. Desde el depósito de líquido de la fuente de presión 30 se llena el espacio hueco 31 con una suspensión de células a través de la tubería a presión 13. Las células de crecimiento adherente (por ejemplo, fibroblastos, macrófagos o células tumorales) pueblan activamente la superficie interior 14. En muchos tipos celulares se inicia una inhibición por contacto cuando la superficie del sustrato está completamente cubierta. Es decir, la proliferación finaliza en cuanto se haya formado una monocapa. Este proceso se puede regular selectivamente mediante la expansión de acuerdo con la invención de la superficie de la herramienta.

45

El espacio interior 31 se puede llenar, sucesiva o simultáneamente, con diferentes tipos celulares, tal como se muestra en la variante de mayor expansión en la figura 2, generándose un material celular histioideo con una función correspondiente a la de los tipos celulares implicados en la formación del material celular. También en esta variante el espacio interior 31 puede estar en contacto electrofisiológico con el medio exterior 81.

50

La figura 3 muestra un ejemplo de un movimiento de extensión radial de una herramienta de estructura capilar 10 cuyo cuerpo 11 se compone de un material elástico (por ejemplo, plástico, goma) o un material no elástico extensible (por ejemplo, láminas de acero o plástico o similares desplazables unas respecto a otras). Mediante un aumento de presión en el canal hueco 31 de la herramienta 10 se puede extender su diámetro, efectuándose un desplazamiento de las células sin dañarlas. El diámetro del cuerpo de herramienta 11 se amplía a la velocidad de avance antes descrita.

Las figuras 4 y 5 ilustran una herramienta de manipulación 10 que presenta una pluralidad de elementos de forma 15 que se pueden desplazar individualmente con un dispositivo de ajuste 30 que está fijado a una pieza de base (no representada). Cada elemento de forma 15 posee forma de paralelepípedo con una cara superior 16. El número total de caras superiores 16 o al menos un elemento cubridor 17 flexible en capas dispuesto sobre ellas (véase la figura 5) constituyen la superficie 12 de la herramienta de manipulación 10 que se utiliza para la conformación del material celular 20. Los elementos de forma 15 componen el cuerpo de herramienta. Las caras superiores 16 poseen dimensiones típicas comprendidas en el intervalo de 0,01 mm a 5 mm. Los elementos de forma 15 están orientados de tal manera que las caras superiores 16 formen una disposición matricial de filas y columnas rectas. El desplazamiento de los elementos de forma 15 en relación con la pieza de base se efectúa, por ejemplo, con motores de ajuste o accionamientos piezoeléctricos. La superficie de la herramienta se estructura en función del avance seleccionado de un elemento de forma 15. Algunos elementos de forma 15 aislados pueden ser separables del dispositivo de ajuste 30, por ejemplo para crear orificios en el material celular.

El elemento cubridor 17 presenta las ventajas de que la superficie de la herramienta se alisa localmente y se facilita el desprendimiento del material celular de la herramienta. El elemento cubridor 17 comprende, por ejemplo, una hoja (por ejemplo, poliuretano) o una membrana que se extiende por todos los elementos de forma 15 y sobre la cual están dispuestas las células. De manera alternativa se pueden prever uno o varios elementos cubridores 17 que se extienden sólo por uno o varios grupos parciales de elementos de forma 15. En algunas o todas las caras superiores 16 de los elementos de forma 15 se puede prever una adhesión separable del elemento cubridor 17.

El elemento cubridor 17 se puede componer de un material polimérico sintético y/o de un material presente de manera natural en organismos biológicos, tal como, por ejemplo, quitina o material de la matriz ósea, dispuesto en una o varias capas. El elemento cubridor 17 puede llevar, además, un recubrimiento estructurado que, por una parte, fomente la unión adhesiva de las células biológicas en unas zonas parciales y, por otra, la bloquee en otras zonas parciales.

Para la formación, de acuerdo con la invención, del material celular, éste se dispone primero sobre la superficie de la herramienta 12, es decir, sobre la totalidad de las caras superiores 16 o del elemento cubridor 17 común. Para ello se prevé, por ejemplo, el crecimiento en un recipiente de cultivo 82 (véase la figura 5) partiendo de un medio de cultivo 81. Por motivos de claridad se muestran en la figura 4 solo células 21 aisladas. A continuación se efectúa un ajuste de la superficie de la herramienta de manipulación 10 haciendo avanzar los elementos de forma 15 a las posiciones deseadas en cada caso. Este avance se lleva a cabo a la velocidad de referencia fisiológica antes mencionada, de manera que durante la deformación del material celular se produce un desplazamiento y reorganización de las células sin dañarlas. A continuación se puede desprender el material celular de la herramienta de manipulación 10.

La figura 4 ilustra también que las caras superiores 16 individuales de los elementos de forma 15 pueden estar configuradas de distintas formas para modificar el material celular adicionalmente en las posiciones correspondientes. Se pueden prever, por ejemplo, microestructuras (véase 16a) para mejorar la adherencia de la cara superior 16 o elementos estructurales adicionales, como, por ejemplo, la forma piramidal 16b, para la creación de una estructura en el material celular. Algunos o todos los elementos de forma 15 pueden llevar asimismo un recubrimiento que aumente la adhesión 16c.

De manera alternativa, una herramienta de manipulación 10 según la figura 4 se puede utilizar como herramienta de impresión, tal como se ilustra mediante la secuencia de imágenes en la figura 6. En una situación de partida según la figura 6A se encuentra sobre un soporte 80 un material celular 20 que se ha de deformar según el procedimiento de acuerdo con la invención. Encima de la superficie, inicialmente libre, del material celular 20 se dispone la herramienta de manipulación 10 con la pluralidad de elementos de forma 15 diferentes. La herramienta de manipulación 10 se aproxima al material celular 20 hasta que las caras superiores 16, orientadas en este caso hacia abajo, entren en contacto con el material celular 20. A continuación se lleva a cabo, según la figura 6B, un ajuste de la superficie 11 de la herramienta de manipulación 10 haciendo avanzar selectivamente algunos elementos de forma 15 individuales. El movimiento de avance se lleva a cabo a la velocidad de referencia fisiológica antes mencionada de las células biológicas. Los elementos de forma 15 individuales desplazan las células en el material celular sin dañarlas.

A continuación se retira la herramienta de manipulación 10 según la figura 6C. La forma de la superficie de la herramienta se conserva en el material celular 20 en forma de estructura complementaria. Para facilitar la separación de la herramienta de manipulación 10 del material celular 20 se pueden dotar las caras superiores 16 de los elementos de forma 15 de un recubrimiento en el cual se inhiba la adhesión de las células. El recubrimiento se lleva a cabo, por ejemplo, con el polímero poli(HEMA). Por último, los huecos impresos en el material celular se pueden rellenar con otras células o con un material matricial sintético 25 según la figura 6D.

La elección de la forma y, dado el caso, de las células o los aditivos 25 introducidos en el material celular se realiza en función del objetivo concreto que se desee alcanzar en el marco de la ingeniería tisular. Con la secuencia según la figura 6 se pueden poner en contacto, por ejemplo, células epiteliales de una estructura predeterminada con células de tejido.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la formación de material celular (20) con una pluralidad de células biológicas (21) que presentan una disposición geométrica predeterminada, **caracterizado por** las etapas:
 - proporcionar una herramienta de manipulación (10) con un cuerpo de herramienta (11) cuya superficie (12, 14) está en contacto, al menos parcialmente, con el material celular (20), y
 - 5 - ajustar la herramienta de manipulación (10) modificando al menos una de las características de área, orientación en relación con un sistema de referencia fijo, forma superficial y estructura superficial de la superficie (12, 14) de tal modo que se modifique la disposición geométrica de las células (21).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el ajuste de la herramienta de manipulación (10) se efectúa a una velocidad de avance inferior o igual a una velocidad de referencia fisiológica de las células.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el ajuste de la herramienta de manipulación (10) se efectúa a una velocidad de avance comprendida en el intervalo de 0,1 $\mu\text{m/h}$ a 1 mm/h.
4. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que durante el ajuste de la herramienta de manipulación (10) se amplía la superficie (12, 14) de la herramienta de manipulación (10).
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la herramienta de manipulación (10) presenta un material elástico que se expande durante el ajuste.
6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la herramienta de manipulación (10) presenta un material no elástico que se extiende durante el ajuste.
7. Procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, en el que la herramienta de manipulación (10) presenta un cuerpo hueco (11) con un espacio hueco (31) que se amplía durante el ajuste.
- 20 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el material celular está dispuesto por fuera sobre el cuerpo hueco (11) y/o en el espacio interior (31) del cuerpo hueco (11).
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que durante el ajuste de la superficie (12, 14) se produce una adhesión de células individuales o grupos de células a la superficie (12, 14) por fuera y/o dentro del cuerpo hueco (11).
- 25 10. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que el material celular se dispone en capas de diferentes tipos celulares por fuera y/o dentro del cuerpo hueco (11).
11. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes 7 a 10, en el que para el ajuste del cuerpo hueco (11) se aplica una presión al espacio interior (31) a través de una tubería a presión (13).
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que para el ajuste del cuerpo hueco (11) se introduce una suspensión de células en el espacio interior.
- 30 13. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes 7 a 12, en el que entre el espacio interior del cuerpo hueco (11) y su entorno se efectúa un intercambio de sustancias.
14. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que el cuerpo de herramienta contiene al menos un elemento de forma (15) que durante el ajuste de la herramienta de manipulación (10) se desplaza de manera que se modifique la forma de la superficie (12).
- 35 15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el cuerpo de herramienta contiene una pluralidad de elementos de forma (15) que se desplazan durante el ajuste de la herramienta de manipulación (10).
16. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que durante el ajuste de la herramienta de manipulación (10), la superficie (12) y/o los elementos de forma (15) se introducen, al menos parcialmente, en el material celular (20) y se genera una impresión de la superficie (12) de la herramienta de manipulación (10) en el material celular (20).
- 40 17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que sobre el material celular (20) se disponen células adicionales o un material matricial sintético (25).
18. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que el material celular (20) comprende un material compuesto formado por las células biológicas o por las células biológicas y un material matricial.

19. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que la disposición geométrica de las células (21) se modifica con la herramienta de manipulación (10) en el exterior de un organismo animal o humano.
20. Herramienta de manipulación (10) para la formación de material celular (20) con una pluralidad de células biológicas (21) que presentan una disposición geométrica predeterminada, **caracterizada por:**
- 5 - un cuerpo de herramienta (11) con al menos una superficie (12, 14), y
- un dispositivo de ajuste (30) para ajustar el cuerpo de herramienta (11) de manera que se modifique al menos una de las características de área, orientación en relación con un sistema de referencia fijo, forma superficial y estructura superficial de la superficie (12, 14).
- 10 21. Herramienta de manipulación según la reivindicación 20, en la que en el dispositivo de ajuste (30) para ajustar el cuerpo de herramienta (11) se establece una velocidad de avance que es inferior o igual a una velocidad de referencia fisiológica de las células (21).
22. Herramienta de manipulación según la herramienta 21, en la que en el dispositivo de ajuste (30) para ajustar el cuerpo de herramienta (11) se establece una velocidad de avance comprendida en el intervalo de 0,1 $\mu\text{m/h}$ a 1 mm/h.
- 15 23. Herramienta de manipulación según al menos una de las reivindicaciones 20 a 22, en la que la superficie (12) del cuerpo de herramienta (11) está configurada para ampliarse durante el ajuste.
24. Herramienta de manipulación según la reivindicación 23, en la que el cuerpo de herramienta (11) presenta un material elástico.
25. Herramienta de manipulación según la reivindicación 23, en la que el cuerpo de herramienta (11) presenta un material no elástico extensible.
- 20 26. Herramienta de manipulación según la reivindicación 24 ó 25, en la que el cuerpo de herramienta comprende un cuerpo hueco (11) con un espacio interior (31) que se amplía durante el ajuste.
27. Herramienta de manipulación según la reivindicación 26, en la que el cuerpo hueco (11) está conectado con una fuente de presión (30) a través de una tubería a presión (13).
- 25 28. Herramienta de manipulación según la reivindicación 23, en la que el cuerpo de herramienta (11) contiene al menos un elemento de forma (15) desplazable.
29. Herramienta de manipulación según la reivindicación 28, en la que el cuerpo de herramienta (11) contiene una pluralidad de elementos de forma (15) desplazables que están dispuestos en forma de matriz en filas y columnas rectas.
30. Herramienta de manipulación según la reivindicación 28 ó 29, en la que sobre los elementos de forma (15) está dispuesto al menos un elemento cubridor (17) que forma la superficie (12).
- 30 31. Herramienta de manipulación según al menos una de las reivindicaciones 20 a 30, en la que sobre la superficie (12) está prevista una estructura o recubrimiento que fomenta la unión adhesiva de las células biológicas.
32. Herramienta de manipulación según al menos una de las reivindicaciones 20 a 31, en la que sobre la superficie (12) está prevista una estructura o recubrimiento que bloquea la unión adhesiva de las células biológicas.

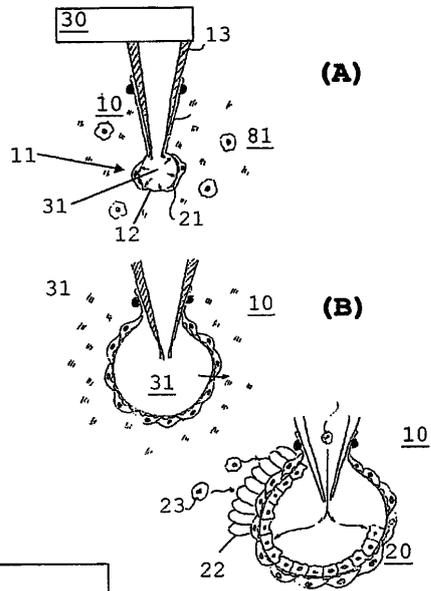


Figura 1

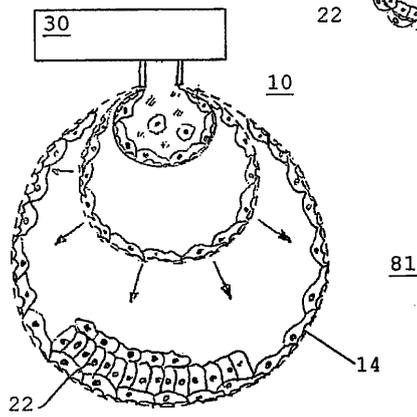


Figura 2

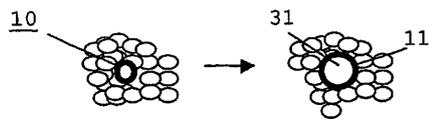


Figura 3

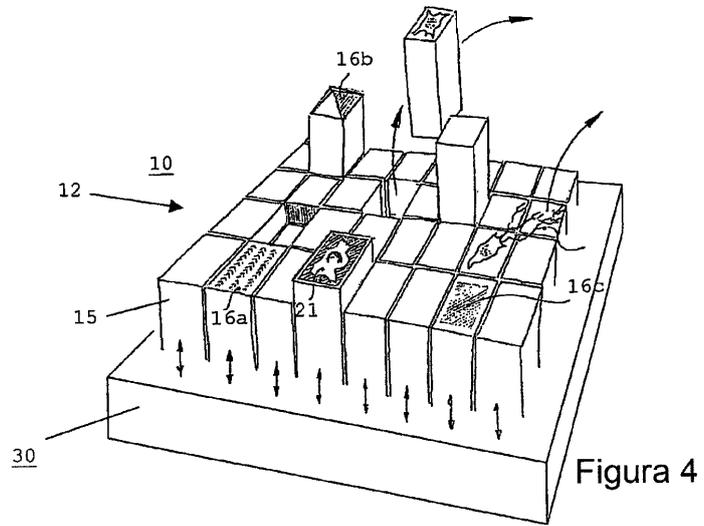


Figura 4

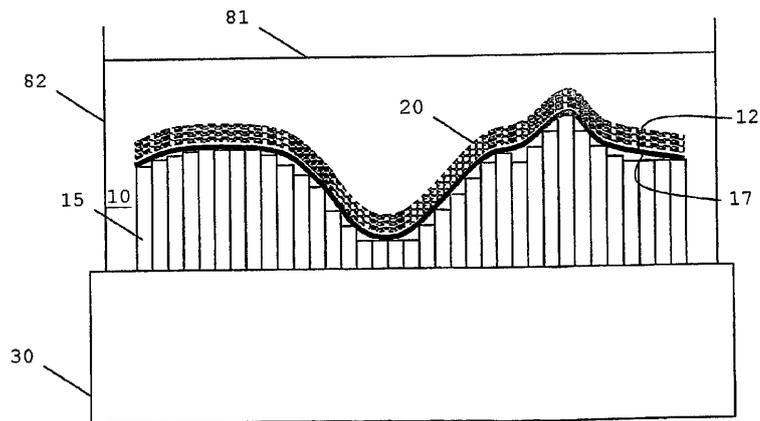


Figura 5

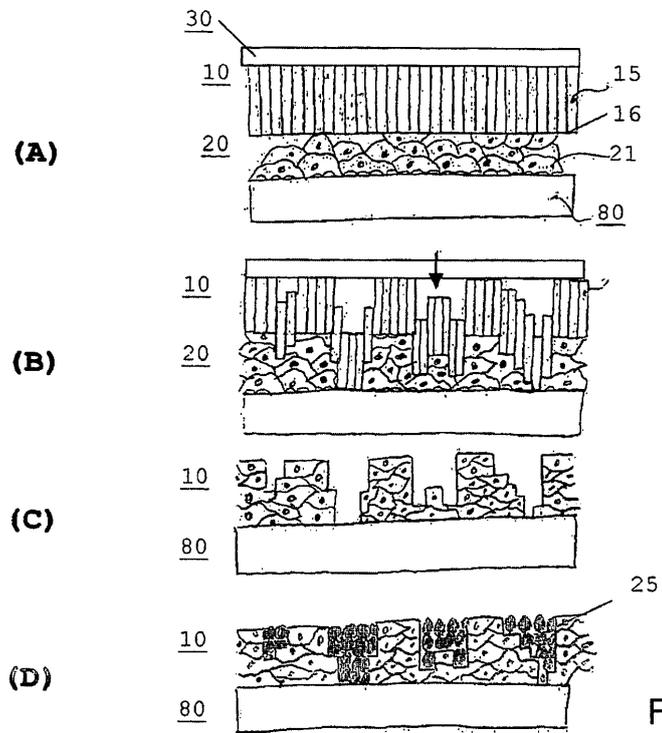


Figura 6

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

5 Documentos de patente indicados en la descripción

- US 5108926 A [0006]

Literatura de patentes no citadas en la descripción

- **M. ABERCROMBIE et al.** The Locomotion Of Fibroblasts In Culture. *Experimental Cell Research*, 1971, vol. 67, S. 359-367 [0014]
- **L. P. CRAMER.** Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility. *Biochem. Soc. Symp.*, 1999, vol. 65, 173-205 [0014]
- **G. FUHR et al.** *Biol. Chem.*, 1998, vol. 379, 1161-1173 [0015]