

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 295**

51 Int. Cl.:
C12N 5/07 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06807548 .0**
96 Fecha de presentación: **25.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1957632**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.2008**

54 Título: **Ingeniería genética tisular usando poblaciones puras de células fetales no embrioblásticas aisladas**

30 Prioridad:
28.10.2005 EP 05023702

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITÄT ZÜRICH
PROTEKTORAT FORSCHUNG, RÄMISTRASSE 71
8006 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:
**SCHMIDT, Dörthe;
BREYMANN, Christian;
ZÜND, Gregor;
HOERSTRUP, Simon P. y
ACHERMANN, Josef**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 386 295 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

Ingeniería genética tisular usando poblaciones puras de células fetales no embrioblásticas aisladas

5 La presente invención se refiere a métodos para la producción *in vitro* de replazos tisulares de mamífero usando poblaciones sustancialmente puras de células fetales no embrioblásticas aisladas que tienen la capacidad de diferenciarse en el tipo o tipos celulares que forman el tejido nativo. Los replazos tisulares diseñados por ingeniería genética mediante los métodos de la presente invención son especialmente útiles para reparar estructuras cardiovasculares no funcionales o disfuncionales en pacientes que padecen trastornos cardiovasculares congénitos.

10 El progreso en el tratamiento y regeneración de malformaciones y defectos congénitos ha sido significativo en las pasadas décadas, proporcionando un tratamiento quirúrgico que ha salvado la vida a numerosos pacientes cada año. Hoy en día, por ejemplo, los replazos cardiovasculares mediante prótesis mecánicas o biológicas siguen siendo el tratamiento más habitual para la cardiopatía valvular avanzada con un uso creciente de prótesis biológicas. Sin embargo, esta terapia aún está asociada con varios problemas que provocan una significativa morbilidad y mortalidad. Siendo inherentemente diferentes del tejido que reemplazan, los replazos de válvula tanto mecánicos fabricados como biológicos a menudo están asociados con defectos tales como fallo del material, tasa aumentada de infecciones, tromboembolia y reacciones inmunológicas contra el material foráneo. Además, con la excepción del Principio de Ross, todos los procedimientos de replazo cardiovascular contemporáneos implican estructuras no vivas que carecen de la capacidad de auto-reparación, remodelado o crecimiento.

25 Particularmente en la cirugía cardíaca congénita actual, existe una necesidad sustancial de materiales de replazo apropiados con crecimiento para la reparación de defectos cardíacos congénitos. Este tratamiento quirúrgico está habitualmente basado en válvulas o conductos no autólogos con desventajas que incluyen increscencias tisulares obstructivas y calcificación del replazo. Estas limitaciones y la ausencia de crecimiento, típicamente requieren diversas reoperaciones de los pacientes pediátricos con defectos cardiovasculares asociados con un aumento en la morbilidad y la mortalidad cada vez.

30 Los replazos tisulares ideales serían una copia de sus equivalentes nativos. Particularmente en ingeniería genética de tejidos cardiovasculares, dichos replazos deben mostrar una función mecánica adecuada, durabilidad, un rendimiento hemodinámico adecuado, así como la ausencia de reacciones inmunogénicas, trombogénicas y/o inflamatorias.

35 La ingeniería genética tisular aspira a cumplir estos requisitos mediante la fabricación *in vitro* de replazos tisulares autólogos vivos. Por lo tanto, se obtienen y se aíslan células autólogas del tejido del paciente. Después del aislamiento, las células se expanden usando tecnología de cultivo *in vitro* y se siembran en matrices tridimensionales biodegradables, que pueden ser de origen biológico o sintético. Para el procedimiento de siembra, es necesaria una cantidad inicial suficiente de células para posibilitar la maduración apropiada del neo-tejido. El éxito de este procedimiento de ingeniería tisular depende de tres elementos principales: (1) la matriz biodegradable (estructura) que determina la forma tridimensional y sirve como estructura de guía inicial para la adhesión celular y el desarrollo tisular; (2) la fuente de células a partir de la cual se cultiva un tejido vivo; y (3) las condiciones de cultivo *in vitro* de la construcción viva antes de su implante.

45 Particularmente en ingeniería genética tisular cardiovascular, estos tres elementos tienen que elegirse y controlarse de un modo altamente organizado para cumplir los elevados requisitos mecánicos del neo-tejido en el momento del implante. Por ejemplo, para crear una válvula cardíaca funcional con las propiedades mecánicas del equivalente nativo, es crucial un rápido desarrollo de la matriz extracelular. Por lo tanto, la elección de las células que son responsables de la producción de una matriz extracelular es un factor importante. Actualmente se usan dos tipos celulares para la fabricación de tejidos cardiovasculares: células con la capacidad de formar matriz extracelular, habitualmente miofibroblastos, y células endoteliales con características antitrombogénicas. El procedimiento de siempre en estructuras tridimensionales se realiza principalmente de forma secuencial: primero por siembra de los miofibroblastos, seguido de las células endoteliales (Zund et al. (1998) Eur. J. Cardiothorac. Surg. 13,160-164). Las estructuras sembradas pueden cultivarse en sistemas estáticos o dinámicos, que tienen por objetivo un óptimo desarrollo tisular *in vitro*. Se ha demostrado que el acondicionamiento mecánico acelera la producción de tejidos funcionales viables, haciendo que sean apropiados para su implante (Niklason et al. (1999) Science 284, 489-493; Hoerstrup et al. (2000) Tissue Eng. 6, 75-79).

60 En contraste con las estructuras altamente estandarizadas y fabricadas industrialmente, la calidad de las células varía de un paciente a otro, dependiendo de las características tisulares individuales y las co-morbilidades. Para crear un replazo tisular vivo y funcional, la elección de la fuente celular es crítica. Más allá de la capacidad de crecimiento y expansión celular, una cuestión importante es la posibilidad de desarrollar un fenotipo celular que coincida con los equivalentes nativos. Se espera que esto tenga un impacto importante sobre la funcionalidad a largo plazo de los replazos (Butcher et al. (2004) J. Heart Valve Disease 13,478-486). El uso de células originarias del tejido a replazar sería el enfoque más seguro. En el caso del diseño de tejido de válvulas cardíacas, se ha demostrado que es factible el uso de células intersticiales valvulares obtenidas por biopsia (Maish et al. (2003) J. Heart Valve Disease 12, 264-269). Sin embargo, con respecto a aplicaciones clínicas, es difícil obtener estas células

y el procedimiento alberga riesgos sustanciales.

Particularmente para la fabricación de replazos tisulares diseñados para aplicaciones pediátricas, aún no se ha identificado la fuente celular ideal. La fuente celular ideal debería ser fácilmente accesible y debe permitir la recolección de células prenatales para tener la construcción tisular diseñada lista en o poco después del nacimiento para evitar daños secundarios en el corazón del bebé.

Estudios previos describían células prenatales de oveja de fluido amniótico como una nueva fuente de células para el diseño de tejidos para la reconstrucción del diafragma en un modelo animal (Kaviani et al. (2003) J. Am. Coll. Surg. 196, 592-597; Fuchs et al. (2004) J. Ped. Surg. 39, 834-838). Kaviani et al. (J. Ped. Surg. 37, 995-999, 2002) informó del uso células derivadas de fluido amniótico obtenidas a las 16 a 21 semanas en comparación con células de placenta humana postnatales obtenidas de placenta proporcionada por cesárea a las 33 a 35 semanas de gestación. Sin embargo, hasta la fecha no pudo demostrarse ni la formación de tejido incluyendo elementos conectivos de matriz extracelular ni la funcionalidad de las construcciones con geometría compleja que han crecido a partir de estas células.

Por consiguiente, el problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar métodos mejorados para la producción de replazos tisulares de mamífero.

La solución del problema técnico anterior se proporciona por las realizaciones de la presente invención definida en las reivindicaciones.

En particular, de acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción *in vitro* de un replazo tisular de mamífero que comprende las etapas de:

- (a) preparar una o más poblaciones sustancialmente puras de células fetales no embrioblásticas aisladas de uno o más tipos *in vitro*, donde el tipo o tipos celulares tienen la capacidad de formar el tejido nativo correspondiente al replazo; y
- (b) cultivar las células fetales obtenidas en la etapa (a) en condiciones que permitan el desarrollo del replazo tisular.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el hallazgo de que la separación y aislamiento de esos tipos celulares fetales no embrioblásticos que tienen capacidad de formar el replazo tisular deseado es esencial para el desarrollo de replazos que se parezcan más estrechamente a sus correspondientes estructuras desarrolladas en el entorno natural, mostrando de este modo propiedades bioquímicas, mecánicas y fisiológicas óptimas.

Las células fetales usadas en el método de acuerdo con la presente invención pueden seleccionarse, por tanto, de acuerdo con el tipo o tipos celulares presentes en el tejido de origen natural que tiene que remplazarse.

Ejemplos de células fetales adecuadas son fibroblastos, miofibroblastos, células hematopoyéticas, células endoteliales, condrocitos, condroblastos, osteocitos, osteoblastos, células epiteliales así como progenitores de dichos tipos celulares.

Para proporcionar replazos tisulares que correspondan en sus características lo mejor posible a los equivalentes nativos, es esencial que las células fetales se aislen de un modo que se separen tipos celulares sustancialmente puros de otros. La expresión "población celular sustancialmente pura", como se usa en este documento, significa una población homóloga de células que presentan no solamente las propiedades morfológicas sino también las propiedades funcionales del tipo o linaje celular respectivo. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la población celular sustancialmente homóloga contiene, por ejemplo, no más del 5%, preferiblemente no más del 1%, más preferiblemente no más del 0,1% de células que no pertenecen al tipo celular deseado respectivo. En otras palabras, la población de células aisladas es, por ejemplo, al menos un 95%, preferiblemente al menos un 99%, más preferiblemente al menos un 99,9% pura.

Como saben los especialistas en la técnica, el tipo o tipos celulares deseados pueden identificarse convenientemente y, de acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, aislarse y separarse por el uso de marcadores moleculares tales como marcadores intracelulares o de superficie celular que son característicos del tipo o tipos celulares individuales. Por ejemplo, las células fetales deseadas pueden aislarse por técnicas de clasificación celular apropiadas, preferiblemente métodos de citometría de flujo, en particular, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y/o clasificación de células magnéticas, usando anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos de tipo celular, especialmente antígenos de superficie celular, tales como CD133, CD34 u otros marcadores específicos. Los anticuerpos contra antígenos específicos de tipo celular, opcionalmente marcados con marcas fluorescentes apropiadas o acoplados a perlas magnéticas, están disponibles en el mercado de diversos proveedores, por ejemplo Serotec Ltd., Oxford, RU. También hay información disponible acerca del antígeno que debe seleccionarse para aislar un tipo celular particular de los proveedores de anticuerpos correspondientes. El procedimiento de clasificación de acuerdo con la presente invención permite separar diferentes tipos celulares y cultivar, si es necesario, dos o más tipos celulares que son necesarios para formar un replazo tisular de un modo

altamente organizado de modo que el remplazo cumpla de forma óptima los requisitos mecánicos, fisiológicos y bioquímicos del tejido nativo.

5 El equipo para la clasificación celular, en particular FACS o clasificación de células magnéticas, está disponible en el mercado, por ejemplo, el equipo FACS puede obtenerse de Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EEUU (FACStar® Plus). Los componentes y dispositivos para clasificación de células magnéticas están disponibles, por ejemplo, MACS® en Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Alemania. De acuerdo con realizaciones preferidas adicionales de la presente invención, el aislamiento y separación del tipo o tipos celulares deseados se realiza usando sistemas de alto rendimiento (HTS) automatizados disponibles en el mercado. FACS así como la
10 clasificación de células magnéticas es especialmente adecuado para este propósito.

La expresión "reemplazo tisular de mamífero" de acuerdo con la presente invención significa cualquier tejido presente en una especie de mamífero que tiene que remplazarse debido a una disfunción o mal funcionamiento. Los ejemplos de reemplazos tisulares diseñados por ingeniería genética por el método de acuerdo con la presente invención incluyen estructuras cardiovasculares tales como válvulas cardíacas y partes de las mismas, vasos sanguíneos y partes de los mismos (por ejemplo, parches), reemplazos de diafragma, cartílago, tejido óseo, reemplazos dérmicos etcétera. En principio, cualquier tejido puede diseñarse por ingeniería genética por los métodos de la presente invención eligiendo el tipo o tipos celulares requeridos o sus progenitores necesarios para formar el tejido deseado (por ejemplo, condrocitos y/o condroblastos o sus progenitores para diseñar por ingeniería cartílago, osteoblastos y/o osteocitos o sus progenitores para producir tejido óseo, células epiteliales o sus progenitores para la fabricación de reemplazos dérmicos, etc.). Preferiblemente, las células progenitoras se eligen, aíslan, diferencian en el tipo o tipos celulares deseados usando factores de crecimiento apropiados, se expanden y se siembran en una estructura adecuada.

25 En el caso de reemplazos tisulares tales como estructuras cardiovasculares (por ejemplo, válvulas cardíacas, vasos sanguíneos o partes de los mismos tales como parches) o estructuras de reconstrucción del diafragma, la etapa (b) del método definido anteriormente comprende las sub-etapas de:

- 30 (i) sembrar las células fetales obtenidas en la etapa (a) definida anteriormente en una estructura tridimensional; y
(ii) cultivar la estructura en condiciones que permiten el desarrollo del reemplazo tisular.

Una "estructura tridimensional", como se usa en este documento, significa un vehículo para el cultivo de las células fetales de modo que éstas construyan un tejido funcional que pueda reemplazar un equivalente de origen natural. La estructura o vehículo es una estructura acelular, preferiblemente compuesta por fibras sintéticas o una matriz de tejido conectivo acelular. Por lo tanto, el material que forma la estructura tridimensional es preferiblemente una estructura que contiene fibras poliméricas, una estructura polimérica porosa o una matriz de tejido biológico acelular. Típicamente, la estructura es biológicamente degradable de modo que, cuando se implanta en un paciente que necesita el reemplazo tisular correspondiente, la estructura se degrada después de un cierto periodo de tiempo dejando el reemplazo tisular maduro restante que se ha formado por las células fetales no embrioblásticas aisladas. Los ejemplos de materiales de vehículo biológicamente degradables son ácidos poliglicólicos (PGA), ácido poliláctico (PLA), polihidroxialcanoato (PHA) y poli-4-hidroxibutirato (P4HB) y mezclas de dos o más de los materiales anteriores así como mezclas con uno o más polímeros adecuados diferentes. El PHA y especialmente el PH4B son particularmente preferidos, ya que estos materiales son termo-moldeables debido a su plasticidad térmica de modo que pueden moldearse en cualquier forma deseada, por ejemplo, en una válvula cardíaca, conducto o parte de la misma. Como se ha mencionado anteriormente, los polímeros anteriores pueden usarse solos o como mezclas de dos o más de las sustancias mencionadas anteriormente así como mezclas de las sustancias junto con otros polímeros biológicamente degradables. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la estructura tridimensional es una mezcla polimérica que contiene el 85% de PGA y el 15% de PLA. De acuerdo con otra realización preferida, la estructura tridimensional está hecha de una mezcla polimérica que contiene PGA y P4HB (opcionalmente junto con otros componentes) en cantidades que varían de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 99% de PGA y una cantidad apropiada de P4HB tal como del 20 a aproximadamente el 0,1% de P4HB. Las mezclas particularmente preferidas son mezclas del 90% de PGA y el 10% de P4HB o del 99% de PGA y el 1% de P4HB. Dichas mezclas poliméricas son típicamente moldeables a temperaturas de aproximadamente 60 a 70°C, lo que posibilita que puedan formarse en estructuras tubulares (por ejemplo, para construir vasos o partes de los mismos) o válvulas cardíacas.

Se describen realizaciones preferidas adicionales con respecto a estructuras adecuadas y sus propiedades deseadas, en particular con respecto a reemplazos tisulares cardiovasculares, en el documento EP-A-1 077 072.

60 Especialmente en el caso de reemplazos cardiovasculares, la realización preferida anterior del método de acuerdo con la presente invención, donde las células fetales se siembran en una estructura tridimensional que después se cultiva en condiciones que permiten el desarrollo del reemplazo tisular deseado, puede realizarse usando diferentes tipos celulares que preferiblemente se siembran y cultivan de un modo secuencial. Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferida adicional, el método anterior que usa estructuras tridimensionales comprende las sub-etapas de:

- (1) sembrar células fetales que tienen capacidad de formar matriz extracelular sobre una estructura tridimensional;
- (2) cultivar la estructura hasta que se haya formado una estructura de tejido conectivo;
- (4) sembrar células fetales que tienen características antitrombogénicas sobre la estructura que contiene la estructura de tejido conectivo y
- (4) cultivar adicionalmente la estructura sobre al menos una monocapa de las células fetales que tienen propiedades antitrombogénicas, que se ha formado sobre la estructura de tejido conectivo.

Por lo tanto, en particular para la producción de estructuras cardiovasculares, es esencial proporcionar a las estructuras tridimensionales no solamente células que formen una matriz extracelular que contenga sus componentes típicos, por ejemplo, colágeno, elastina y glucosaminoglucanos (además de las células que componen los componentes extracelulares básicos), sino también proporcionar a la estructura de tejido conectivo formado de este modo una capa celular que tenga características antitrombogénicas. Típicamente, las células que tienen capacidad para formar matriz extracelular son fibroblastos y/o miofibroblastos o sus células progenitoras. Además, las células fetales que tienen propiedades antitrombogénicas pueden seleccionarse entre células endoteliales o células progenitoras de las mismas.

Con respecto a realizaciones preferidas adicionales de este método preferido de acuerdo con la presente invención, de nuevo se hace referencia al contenido de la descripción respectiva del documento EP-A-1 077 072.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, la fuente de las células fetales no embrioblásticas puede ser sangre materna, tejido materno, fluido amniótico y/o vellosidades coriónicas.

Respecto a las estructuras anatómicas y los tejidos de los replazos deseados, el momento puntual de recolección celular es un factor importante con respecto a los tipos celulares accesibles y la calidad de las células. Particularmente en la parte fetal no embrioblástica del donante, el desarrollo a partir de vellosidades coriónicas secundarias en vellosidades coriónicas terciarias mesenquimáticas de origen vascular es una importante reconstrucción dependiente del tiempo (que empieza en aproximadamente la 3ª semana de embarazo). Estas vellosidades representan una atractiva fuente celular de diversas células progenitoras diferentes hasta que se transforman de nuevo en vellosidades intermedias maduras, en lugar de en las inmaduras en aproximadamente la 23ª semana de embarazo. Por lo tanto, en general, pero en particular con respecto a células obtenidas a partir de vellosidades coriónicas, la recolección de las células deseadas en una fase temprana del embarazo, por ejemplo en el intervalo de aproximadamente la 5ª a aproximadamente la 23ª semana de embarazo, más preferiblemente de aproximadamente la 11ª a aproximadamente la 15ª semana de embarazo, aumenta la calidad de las células, ya que pueden diferenciarse en diversos tipos celulares, mejorando de este modo la calidad del tejido de los replazos diseñados por ingeniería genética.

Además, los inventores han descubierto que las células fetales aisladas de acuerdo con la etapa (a) del método de la invención definido anteriormente pueden almacenarse congeladas, preferiblemente por crioconservación, antes de cultivarse *in vitro* (por ejemplo, sembrarse y expandirse y cultivarse adicionalmente) para formar el replazo tisular deseado. Incluso más sorprendentemente, los replazos tisulares diseñados por ingeniería genética por el uso de células crioconservadas muestran apenas diferencias con los replazos formados directamente a partir de células fetales frescas. Preferiblemente, las células fetales que tienen que almacenarse congeladas se expanden antes de la crioconservación. La crioconservación puede realizarse convenientemente usando un medio convencional que contenga DMSO o compuestos comparables tales como glicerol.

Esta realización preferida de la presente invención posibilita almacenar las células respectivas durante un periodo deseado de tiempo hasta que se necesiten para aplicaciones posteriores. Por tanto, es posible construir una biblioteca celular prenatal para posteriores aplicaciones autólogas o alogénicas postnatales (por ejemplo, para miembros de la familia u otros parientes genéticos).

Como se ha mencionado anteriormente, el método de la presente invención es particularmente útil para la producción de estructuras cardiovasculares para el replazo de tejidos disfuncionales o de mal funcionamiento, por ejemplo, en pacientes que padecen cardiopatías congénitas.

Las estructuras cardiovasculares preferidas como replazos de la presente invención son válvulas cardíacas, vasos sanguíneos o partes de los mismos tales como parches o cúspides de las válvulas cardíacas.

Preferiblemente, el replazo tisular es un replazo tisular humano.

Cuando se cultiva la estructura para desarrollar el replazo tisular de mamífero, el cultivo puede ser en condiciones estáticas o dinámicas. Las condiciones dinámicas son especialmente útiles para la producción de estructuras cardiovasculares como se describe en el documento EP-A-1 077 072. El cultivo se realiza preferiblemente en un biorreactor adecuado tal como dispositivos correspondientes descritos en el documento EP-A-1 077 072 o el documento WO-A-2004/10112.

Por lo tanto, especialmente con respecto a la producción de estructuras cardiovasculares tales como válvulas cardíacas, vasos sanguíneos o partes de los mismos, el nuevo enfoque de acuerdo con la presente invención comprende preferiblemente las siguientes etapas:

- 5 - recolección de tejido prenatal que contiene células fetales no embrioblásticas (por ejemplo, vellosidades coriónicas, fluido amniótico, sangre materna o tejido materno), por ejemplo, por métodos convencionales bien establecidos para el aislamiento en una fase temprana del embarazo, preferiblemente entre la 11ª y la 15ª semanas de gestación;
- aislamiento de diversas células fetales cada una de tipo sustancialmente puro, por ejemplo de
10 aproximadamente 5 a 30 mg de vellosidades coriónicas obtenidas de muestreo prenatal por digestión (por ejemplo, triptica, con colagenasa) de las vellosidades, preferiblemente en dos etapas, o a partir de fluido amniótico (por ejemplo, de 2,5 a 20 ml) o, como alternativa, a partir de sangre o tejido materno;
- expansión de células fetales aisladas que también pueden usarse para diagnóstico prenatal para evaluar el fenotipo y la calidad de las células obtenidas;
- 15 - dependiendo de las necesidades, las células pueden
 - almacenarse congeladas (por ejemplo, crioconservadas) para su aplicación posterior; o
 - expandirse directamente en elevadas cantidades de células para la preparación de reemplazos autólogos vivos diseñados por ingeniería genética de tejidos;
- 20 - siembra de aquellas células que tengan capacidad de formar matriz extracelular sobre matrices tridimensionales biodegradables (estructuras) (que tienen el aspecto o forma deseada, por ejemplo, una válvula cardíaca, vaso o parche);
- cultivo en un biorreactor *in vivo*, por ejemplo, en condiciones dinámicas/estáticas, preferiblemente como se describe en el documento en EP-A-1 077 72;
- 25 - endotelización de las superficies de las construcciones obtenidas; y
- explante del templazo tisular listo para su uso desde el biorreactor

Está claro para un especialista en la técnica que no deben realizarse necesariamente todas las etapas mencionadas anteriormente. En particular, las etapas pueden solaparse y/o una o más etapas pueden omitirse (por ejemplo, en caso de que las células se usen directamente para la fabricación de un reemplazo, la etapa de crioconservación de las células se omite). En el caso de la producción de estructuras cardiovasculares, se usan preferiblemente miofibroblastos o fibroblastos y/o sus células progenitoras para construir la matriz extracelular necesaria para la formación de una estructura de tejido conectivo funcional. Además, está claro para los especialistas en la técnica que pueden emplearse otras células que tengan la capacidad de producir una matriz extracelular. Para una función óptima de la estructura cardiovascular diseñada por ingeniería genética, es necesario proporcionar al reemplazo tisular una superficie que tenga propiedades antitrombogénicas. Preferiblemente, se usan células endoteliales para este propósito (la llamada "endotelización"). Este proceso también puede realizarse usando células progenitoras endoteliales u otras células con propiedades endoteliales o antitrombogénicas. Para la preparación del reemplazo tisular, pueden usarse medios celulares comunes tales como DMEM, EGM®-2 etc. que pueden suplementarse con uno o más de los siguientes componentes: factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos humanos (hFGF), factor de crecimiento-1 tipo insulina largo recombinante humano (R3-IGF), factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), gentamicina y anfotericina (GA-1000), hidrocortisona, heparina, ácido ascórbico y suero bovino fetal. Después de un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo cuatro días, las células adheridas se vuelven a sembrar y pueden usarse para cultivo adicional. Para la crioconservación, puede usarse un medio celular que contenga DMSO o componentes similares.

El método de acuerdo con la presente invención proporciona varias ventajas, incluyendo:

- 50 - aislamiento de poblaciones celulares sustancialmente puras que contienen todos los tipos celulares necesarios para la producción de un tejido diseñado por ingeniería genética que se parece muy estrechamente al equivalente nativo;
- las células fetales puede recolectarse a partir de tejidos prenatales usados de forma rutinaria para diagnóstico prenatal y pueden emplearse como fuente de células para ingeniería genética de tejidos de modo que la misma biopsia puede usarse para diseñar tejidos así como para propósitos de diagnóstico sin sacrificar ningún tejido donante intacto;
- 55 - los reemplazos tisulares de acuerdo con la presente invención se basan en prenatal células fetales no embrioblásticas aisladas de modo que el implante final está listo en o poco después del nacimiento para reparar malformaciones congénitas;
- 60 - las células aisladas en una fase temprana de desarrollo, tal como de la 11ª a la 15ª semanas de embarazo, proporcionan una calidad extremadamente elevada de reemplazos tisulares diseñados por ingeniería genética;
- como ha resultado que los tipos celulares fetales aislados pueden crioconservarse antes de usarlos para la fabricación del reemplazo tisular real, es factible construir bibliotecas de células prenatales recolectadas para su posterior aplicación (implantes autólogos o alogénicos, por ejemplo para miembros de la familia u otros parientes genéticos).
- 65

Los presentes inventores han descubierto, por primera vez, que es posible producir replazos tisulares de mamífero usando células fetales aisladas de sangre materna y/o tejido materno. Por lo tanto, de acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere en líneas generales a un método para producir un replazo tisular de mamífero que comprende las etapas de:

- 5
- (I) aislar células fetales de sangre y/o tejido materno *in vitro*; y
 - (II) cultivar las células fetales obtenidas en la etapa (I) en condiciones que permiten el desarrollo del replazo tisular.

10 Con respecto a realizaciones preferidas de células fetales, la fase de la sangre y/o tejido materno (semana de embarazo), el aislamiento de las células (en particular FACS, MACS® etc.), las condiciones de cultivo, los biorreactores, y los replazos tisulares preferidos que pueden producirse, se refieren expresamente a la descripción resumida anteriormente con respecto al primer aspecto de la presente invención.

15 Por lo tanto, de acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención describe en líneas generales el uso de sangre y/o tejido materno para ingeniería genética tisular de mamífero *in vitro*.

En particular, la sangre y/o tejido materno funciona como fuente de células fetales no embrioblásticas. Preferiblemente, la sangre y/o tejido materno está en la fase de aproximadamente la 5ª a aproximadamente la 24ª, preferiblemente de aproximadamente 11ª a aproximadamente la 15ª, semana de embarazo. Sin embargo, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, el momento puntual de recolección celular puede elegirse de acuerdo con las necesidades del caso individual, es decir, en cualquier momento puntual que permita obtener células fetales de la sangre o tejido materno. Por ejemplo, también es posible aislar las células fetales correspondientes de la sangre o tejido materno incluso después del nacimiento. Es especialmente preferido que la

20

25

la sangre y/o tejido materno se use para la producción de una estructura cardiovascular, tal como una válvula cardíaca, vaso sanguíneo o parte del mismo. Más preferido, el tejido diseñado por ingeniería genética es un tejido humano.

De acuerdo con un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para el replazo de un tejido no funcional o disfuncional en un paciente mamífero, que comprende las etapas de:

- 30
- (A) obtener material que contiene células fetales no embrioblásticas;
 - (B) producir un replazo tisular funcional *in vitro* mediante uno o más de los métodos definidos anteriormente de la invención, donde las células fetales se aíslan del material obtenido en la etapa (A); y
 - (C) implantar el replazo tisular en el paciente.
- 35

Como ya se ha indicado anteriormente, los replazos tisulares de mamífero producidos por los métodos descritos anteriormente son especialmente útiles para el tratamiento de enfermedades congénitas. Por lo tanto, se prefiere que el material que contiene células fetales no embrioblásticas se obtenga de la parte no embrioblástica del feto que se desarrolla en el paciente mamífero a tratar. Esto significa que se produce un replazo tisular autólogo de acuerdo con la etapa (B). Como alternativa, también es posible que las células progenitoras fetales no embrioblásticas se usen para producir un replazo tisular para un pariente genético. Un "pariente genético" del paciente mamífero es un miembro de la familia o cualquier otro individuo que presente antígenos de superficie celular similares a los del paciente en cuestión, por ejemplo, en el caso de pacientes humanos, el pariente genético muestra un tipo HLA similar.

40

45

Como ya se ha descrito anteriormente, el material usado para obtener células fetales no embrioblásticas puede seleccionarse entre sangre materna, tejido materno, fluido amniótico y/o vellosidades coriónicas. Más preferiblemente, el material se obtiene en una fase temprana del embarazo, en particular en la fase de aproximadamente la 5ª a aproximadamente la 23ª, más preferiblemente de aproximadamente la 11ª a aproximadamente la 15ª, semana de embarazo.

50

Preferiblemente, el paciente a tratar de acuerdo con el método de la invención es un ser humano, más preferiblemente, un bebé recién nacido. Como anteriormente, el método de la presente invención es especialmente útil para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares congénitas donde el tejido no funcional o disfuncional es una estructura cardiovascular tal como una válvula cardíaca, vaso sanguíneo o cualquier parte de dichas estructuras (por ejemplo, cúspides de una válvula cardíaca).

55

Las figuras muestran:

60 La Fig. 1 muestra una fotografía de una válvula cardíaca tricúspide diseñada por ingeniería genética a partir de células fetales no embrioblásticas derivadas de vellosidades coriónicas.

La Fig. 2 muestra fotografías de análisis histológicos de válvulas cardíacas diseñadas por ingeniería genética de tejidos basadas en células derivadas de vellosidades coriónicas. (A, B) Tinción con hematoxilina y eosina (H y E) que muestra la formación tisular estratificada. (C) La tinción tricrómica de Masson muestra una excelente producción de matriz extracelular (la tinción es específica para el colágeno).

65

La Fig. 3 muestra una representación gráfica de los resultados de análisis bioquímicos de cúspides de válvula cardiaca producidas a partir de células prenatales derivadas de vellosidades coriónicas. Sorprendentemente, tanto las células criopreservadas como las células frescas muestran un contenido similar de componentes de matriz extracelular así como número de células vivas.

La Fig. 4 muestra una representación gráfica del perfil mecánico de una cúspide de válvula cardiaca diseñada por ingeniería genética de tejidos producida a partir de células derivadas de vellosidades coriónicas.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de una válvula cardiaca tricúspide a partir de células fetales aisladas de vellosidades coriónicas

Aislamiento de células fetales no embrioblásticas

Se obtuvieron células fetales no embrioblásticas (de 10 a 30 mg) a partir de muestras de vellosidades coriónicas preparadas de forma rutinaria en la 11^a semana de embarazo. La mayor parte de los tejidos se usaron directamente para diagnóstico prenatal. Usando 5 mg de la muestra de vellosidades coriónicas se aisló por digestión el tejido obtenido. En resumen, las vellosidades coriónicas se lavaron con medio sin suero y se transfirieron a un tubo de centrífuga. El tejido se cubrió completamente con colagenasa y se incubó a 37°C. Durante la incubación, el tubo se agitó cada 15 min. Después de 60 min. las células se centrifugaron y se desechó cuidadosamente el sobrenadante. Las células se suspendieron en tripsina y se incubaron durante 10 min. a 37°C. Después de ello, las células se centrifugaron de nuevo. Después de desechar el sobrenadante, las células se resuspendieron. A partir de esta suspensión celular, pudieron separarse diferentes tipos de células mediante perlas magnéticas usando anticuerpos específicos para antígenos de superficie de células progenitoras. Por tanto, se usó un anticuerpo contra CD133 acoplado a perlas magnéticas para separar las células progenitoras endoteliales que quedaron de este modo atrapadas en una columna magnética, mientras que los progenitores de mioblastos/fibroblastos se recogieron en el flujo continuo. Después, las células CD133-positivas se eluyeron después de la des-magnetización de la columna y se cultivaron en condiciones específicas para células endoteliales, mientras que las células progenitoras en el flujo continuo se diferenciaron en mioblastos/fibroblastos.

Expansión de células fetales aisladas

Las células se cultivaron en medio específico (EGM®-2 suministrado por Cambrex Corp., East Rutherford, NJ, EEUU) que contenía suplementos (factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos humanos (hFGF), factor de crecimiento-1 tipo insulina largo recombinante humano (R3-IGF), factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), gentamicina y anfotericina (GA-1000), hidrocortisona, heparina, ácido ascórbico) y suero bovino fetal al 20%.

Sorprendentemente, ya después de 24 horas las células se adhirieron a las placas de cultivo y empezaron a proliferar (Fig. 2). Ya después de 8 días, las células alcanzaron confluencia en estas condiciones de cultivo. Las células se desprendieron por tripsina y la mitad de las células se criopreservaron usando medio celular que contenía DMSO al 10%. La otra parte se expandió en los siguientes varios días en altas cantidades necesarias para el enfoque de ingeniería genética de tejido cardiovascular. Las células criopreservadas se descongelaron. Cuando se ensayó la viabilidad de las células por tinción con azul de tripano, sorprendentemente, la viabilidad era de aproximadamente el 70%. Las células se cultivaron, se expandieron y se caracterizaron. Las células no criopreservadas se analizaron en paralelo. No pudieron detectarse diferencias respecto a los fenotipos.

Siembra de células fetales aisladas en matrices 3-D y cultivo

Las células expandidas se sembraron en matrices 3-D para la producción de replazos tisulares. La factibilidad del método de acuerdo con la presente invención se demostró diseñando por ingeniería genética una válvula cardiaca autóloga viva. Por tanto, las células aisladas (grupo 1 = células criopreservadas, grupo 2 = células no criopreservadas) caracterizadas como fibroblastos y/o miofibroblastos se sembraron sobre estructuras biodegradables de válvula cardiaca tricúspide ($3,5 \times 10^6 \text{ cm}^2$) y se cultivaron en un biorreactor *in vitro*. Además, una parte de las válvulas cardiacas se expuso a esfuerzo cíclico. Después de 21 semanas, las válvulas cardiacas se endotelizaron y se cultivaron durante 7 días adicionales. Después de ello, las válvulas cardiacas se explantaron desde el biorreactor y se analizó el neo-tejido.

Se muestra un ejemplo de las válvulas cardiacas tricúspide producidas en la Fig. 1.

Análisis de válvulas cardiacas producidas

El análisis incluyó histología, inmunohistoquímica, microscopía electrónica de barrido, detección de producción de matriz extracelular, cantidad de células y ensayo mecánico.

5 Las células mesenquimáticas de placenta frescas y crioconservadas expresaban vimentina, desmina y parcialmente alfa-SMA. Sorprendentemente, los neo-tejidos mostraron una formación tisular estratificada y excelente producción de matriz extracelular hasta los valores nativos (glucosaminoglucanos (GAG) hasta el 100%, 4-hidroxiprolina (HYP) hasta el 30%, ADN hasta el 60%) en ambos grupos (véase la Fig. 3). La expresión de Ki-67 confirmó la proliferación de células en todas partes de los neo-tejidos. La SEM mostró una excelente increscencia celular en las superficies poliméricas y lisas. El ensayo mecánico se aproximó a los perfiles de tejidos nativos de cúspide de válvula cardiaca (véase la Fig. 4). Cuando se comparan con células habitualmente usadas para ingeniería genética de tejido cardiovascular, las células derivadas de vellosidades coriónicas son especialmente adecuadas para la producción de 10
15
20
reemplazos cardiovasculares que muestran características sorprendentemente mejores que los reemplazos producidos a partir de células habitualmente usadas. La Fig. 2 muestra la histología del neo-tejido. La Fig. 4 resume los datos bioquímicos de las válvulas cardiacas producidas. Se da un ejemplo del perfil mecánico de una cúspide en la Fig. 5. La cúspide producida de acuerdo con la presente invención mostró excelentes propiedades mecánicas indicadas por un módulo de Young de $0,722 \pm 0,073$ MPa, una resistencia a tracción de $0,250 \pm 0,013$ MPa, y una tensión a rotura de $0,576 \pm 0,089$ mm/mm.

Ejemplo 2: Producción de una válvula cardiaca tricúspide a partir de células fetales aisladas de fluido amniótico

Se realizó un enfoque similar usando células fetales aisladas de 2,5 ml de fluido amniótico obtenido en la 15^a semana de embarazo, mientras que el resto de la muestra se usó para diagnóstico prenatal. En resumen, el fluido se 25
30
centrifugó y se aislaron las células usando perlas magnéticas para células progenitoras endoteliales. Las células recubiertas positivas así como las células negativas se cultivaron en las condiciones de cultivo mencionadas anteriormente en el Ejemplo 1 y se siguieron las etapas para la fabricación del reemplazo cardiovascular.

En estas condiciones de cultivo, ambos tipos de células mostraron excelente capacidad de proliferación y expresaron todos los marcadores típicos para células tipo miofibroblasto y/o fibroblasto y células endoteliales y/o 30
35
células progenitoras endoteliales, respectivamente. Este resultado es altamente sorprendente, ya que el potencial apoptótico de células derivadas de fluido amniótico no está completamente comprendido a día de hoy. De nuevo, sorprendentemente se generaron válvulas cardiacas autólogas vivas a partir de células progenitoras derivadas de fluido amniótico prenatal ya que las células derivadas de fluido amniótico formaron tejidos cardiovasculares vivos cubiertos con endotelios vasculares.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la producción *in vitro* de un replazo tisular de mamífero que comprende las etapas de:

- 5 (a) preparar una o más poblaciones sustancialmente puras de células fetales CD133-negativas no embrioblásticas aisladas de uno o más tipos *in vitro* por clasificación celular usando un anticuerpo o anticuerpos dirigidos contra el antígeno de superficie CD133 específico de tipo celular, en el que el tipo o tipos celulares tienen la capacidad de formar el tejido nativo correspondiente al replazo; y
- 10 (b) cultivar las células fetales obtenidas en la etapa (a) en condiciones que permiten el desarrollo del replazo tisular,

en el que las células fetales son fibroblastos y sus progenitores, y en el que la etapa (b) comprende las etapas de:

- 15 (1) sembrar las células fetales que tienen capacidad de formar matriz extracelular que son fibroblastos o células progenitoras de los mismos sobre una estructura tridimensional;
- (2) cultivar la estructura en condiciones que permiten el desarrollo del replazo tisular hasta que se haya formado una estructura de tejido conectivo;
- 20 (3) sembrar las células fetales que tienen características antitrombogénicas sobre la estructura que contiene la estructura de tejido conectivo; y
- (4) cultivar adicionalmente la estructura hasta que se haya formado al menos una monocapa de las células fetales que tienen características antitrombogénicas sobre la estructura de tejido conectivo.

2. El método de la reivindicación 1, en el que las células fetales incluyen células miofibroblásticas.

25 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que las células fetales se aíslan de sangre materna, tejido materno, fluido amniótico, y/o vellosidades coriónicas.

30 4. El método de la reivindicación 3, en el que las células fetales se aíslan de vellosidades coriónicas en la fase de la 5ª a la 23ª, preferiblemente de la 11ª a la 15ª, semana de embarazo.

35 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa (a) se realiza por citometría de flujo, preferiblemente clasificación de células activadas por fluorescencia y/o clasificación de células magnéticas.

6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las células fetales obtenidas de la etapa (a) se almacenan congeladas antes de realizar la etapa (b).

40 7. El método de la reivindicación 6, en el que las células fetales se expanden antes de almacenarse congeladas.

8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el replazo tisular es una estructura cardiovascular.

45 9. El método de la reivindicación 8, en el que la estructura cardiovascular es una válvula cardíaca, un vaso sanguíneo o parte del mismo.

10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el replazo es un replazo tisular humano.

Fig. 1

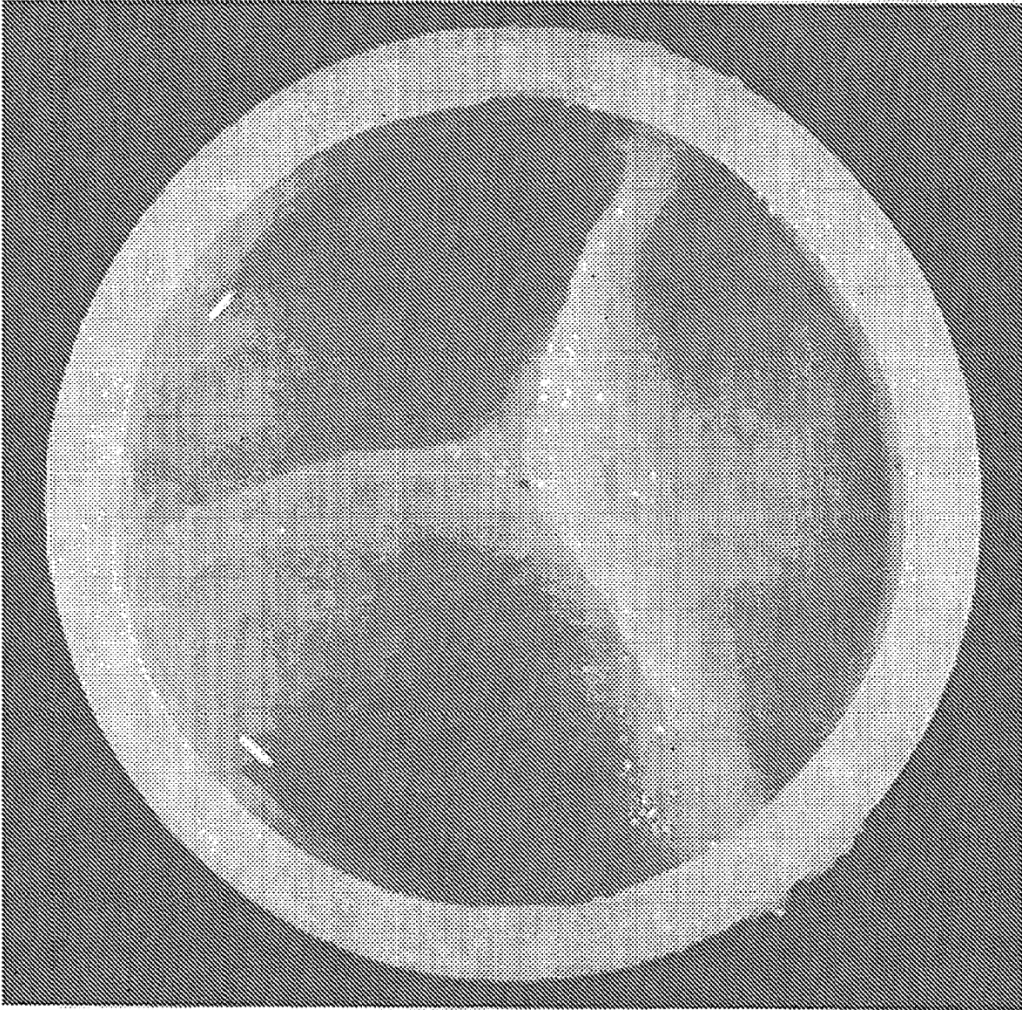


Fig. 2

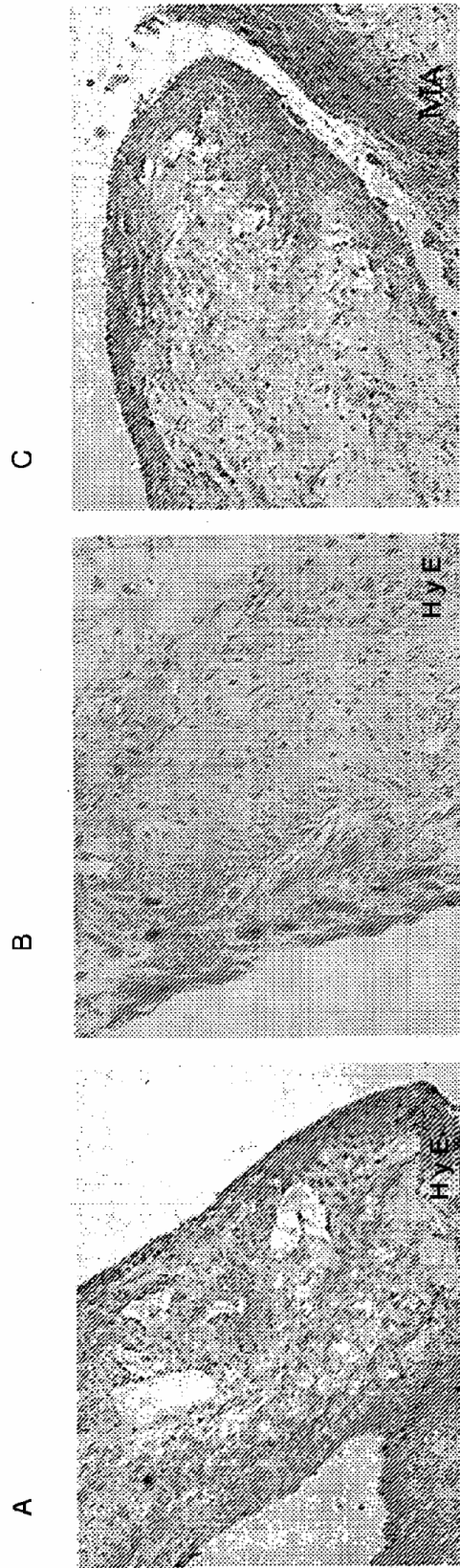


Fig. 3

