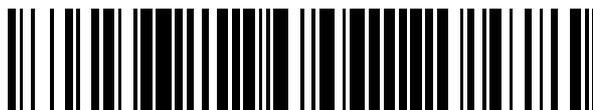


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 817**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/00** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**C12N 11/02** (2006.01)  
**A61L 27/14** (2006.01)  
**A61L 27/56** (2006.01)  
**C08J 9/00** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99958382 .6**  
96 Fecha de presentación: **06.12.1999**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1183328**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.03.2002**

54 Título: **Polímeros microcelulares como medio de crecimiento de células y nuevos polímeros**

30 Prioridad:  
**05.12.1998 GB 9826701**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**14.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**14.12.2012**

73 Titular/es:  
**ITI TECHNOLOGY LIMITED (100.0%)  
Advanced Manufacturing Park, Technology  
Centre, Brunel Way, Catcliffe, Rotherham  
South Yorkshire S60 5WG, GB**

72 Inventor/es:  
**AKAY, GALIP;  
DOWNES, SANDRA y  
PRICE, VICTORIA JANE**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 392 817 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

Polímeros microcelulares como medio de crecimiento de células y nuevos polímeros.

5 La presente invención describe polímeros microcelulares como medio de crecimiento de células, sistemas biológicamente activos y módulos de soporte de órganos que comprenden los polímeros y células biológicas, un método para crecimiento de células en los materiales, el uso de los mismos como implantes en el cuerpo humano o animal o para estudios *in vitro*, nuevos procesos para la preparación y modificación de polímeros microcelulares y los polímeros obtenidos por ellos, y un método para fabricación de un módulo de soporte de órganos.

10 Más específicamente, la presente invención describe polímeros microcelulares que tienen porosidad que excede de 75%, en la forma de una estructura de poros e interconexiones de poros que tiene dimensiones relativas de interconexión y de poro  $d/D$  como medios de crecimiento de células para crecimiento tridimensional de células en todo el polímero, el sistema que comprende esto, método para crecimiento y uso del mismo, y nuevos procesos para la preparación de los mismos y polímeros obtenidos por ellos.

Los materiales orgánico/inorgánico/natural microcelulares sintéticos en los cuales están interconectados los poros se utilizan a menudo como soporte para crecimiento de células vegetales o animales, o enzimas.

15 La elaboración de un soporte microcelular para una aplicación específica de crecimiento de células es a menudo difícil con los materiales microcelulares producidos naturalmente. Recientemente se han realizado esfuerzos para cultivar células sobre materiales microcelulares de nuevo desarrollo, que se preparan por una ruta de polimerización por emulsión de fase interna alta (HIPE) en la cual el volumen de fase de la fase dispersa es mayor que aproximadamente 75% y polimerización y/o reticulación subsiguiente para obtener una estructura rígida, que ofrece muchas ventajas. Estos materiales se han descrito tanto en la literatura públicamente disponible como en descripciones de patente, y se hace referencia a los mismos como polímeros Polyhipe (PHPs).

Se afirma que las características importantes de estos materiales son:

1. el volumen de poro puede ser tan alto como 97% (para propósitos prácticos);
2. los poros están interconectados;
- 25 3. los tamaños de poro y de interconexión pueden controlarse con exactitud e independientemente;
4. pueden lograrse reacciones adicionales de policondensación;
5. la reticulación puede realizarse con proteínas, polímeros, silicatos o polímeros orgánicos, pudiendo obtenerse además una amplia gama de materiales porosos;
- 30 6. es posible la modificación de los PHP después de polimerización/reticulación, lo cual se ve facilitado adicionalmente por la utilización de monómeros funcionales en la etapa de emulsificación;
7. pueden obtenerse PHP en forma de bloque y/o en forma de partícula;
8. dado que los HIPEs pueden bombearse, es posible formar estructuras moldeadas.

35 La patente US 5.071.747 describe la preparación de materiales soporte polímeros microcelulares con diámetro medio de vacío (poro) dentro de un intervalo que va desde 1 a 150  $\mu\text{m}$ , interconectados por huecos (interconexiones). El tamaño de hueco ( $d$ ) está relacionado con el tamaño de vacío ( $D$ ) y su ratio puede controlarse en el intervalo de  $0 < d/D < 0,3$ . El control de la ratio  $d/D$  se realiza por el control de la concentración de agente tensoactivo y por la adición de electrólito, principalmente  $\text{CaCl}_2$  dentro del intervalo de  $10^{-4}$  molar a 5 molar. Los electrólitos se seleccionan de haluros y sulfatos solubles. Se afirma que la función del electrólito la función del electrólito es el control del tamaño de los huecos y la mejora de la estabilidad de la emulsión.

40 En la etapa -1, las fases de aceitosa y acuosa se introducen bajo deformación (agitación) y en la etapa-2, el HIPE resultante se homogeneiza bajo deformación (agitación). Aunque la velocidad de introducción de las fases (el tiempo de dosificación ( $t_D$ )) de la fase dispersa en el mezclador de lotes, y el tiempo de homogeneización ( $t_H$ ) subsiguiente del HIPE se indica en la patente US 5.071.747, las condiciones de mezcla no se especifican. La polimerización va seguida por introducción de células.

45 US 5.071.747 describe el crecimiento isótropo (no direccional) de células vegetales y animales en tres dimensiones (3D) en Polímero Polyhipe (PHP) de polivinilo, el nombre genérico para el material microporoso. Se proporcionan sustancias reaccionantes o nutrientes por la vía de huecos de interconexión (interconexiones) en el PHP para acceder a los vacíos (poros) en los cuales se cultivan las células o se hacen reaccionar para obtener los productos. El PHP se utiliza meramente como medio de crecimiento de células, permitiendo el funcionamiento normal de las células en los vacíos, utilizando los huecos (interconexiones) como canales de acceso. Se proporcionaban vacíos y huecos que tenían un diámetro vacío de 6-12 veces el diámetro de las células a introducir y cultivar, y diámetro de hueco de 3-6 veces, es decir un diámetro vacío de 45 micrómetros y diámetro de hueco de 15 micrómetros en el caso de cultivo de células de levadura del orden de 5 micrómetros. En estos casos, sin embargo, el crecimiento celular era predominantemente crecimiento en superficie. En un ejemplo adicional se utilizaba PHP que tenía porosidad de 90%, diámetro de vacío y hueco de 30 micrómetros y 10 micrómetros respectivamente para crecimiento fúngico, que se encontró penetraba en el retículo de polímero poroso.

55 Sin embargo, la bibliografía proporciona sólo una doctrina limitada con respecto al control del tamaño de poros e interconexiones. En US 5.071.747, citado anteriormente, no se indica de qué modo se lograban las dimensiones

reivindicadas, y de hecho no sería posible obtener dimensiones de poro superiores a 50 micrómetros utilizando la información limitada que se aportaba, ni sería posible controlar o predeterminar un tamaño de poro particular dentro del intervalo de 1-50 micrómetros sin experimentación considerable.

5 La utilidad de los materiales PHP para crecimiento de células se mantiene por tanto extremadamente limitada y hay necesidad de materiales y métodos para preparación de polímeros más complejos que permitan un crecimiento celular más sofisticado.

10 Se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que puede conseguirse un crecimiento coherente de células en polímeros PHP para proporcionar un sistema multicelular co-operativo que es adecuado para numerosos usos y que pueden obtenerse nuevos PHPs que tienen nuevas propiedades adaptadas para usos biológicos y no biológicos. Es particularmente ventajoso que las células co-operan en el PHP de la invención, dado que esto es importante para el crecimiento celular.

15 Se proporciona un método de fabricación de polímeros microcelulares naturales o sintéticos de tipo Polyhipe en la forma de un material alveolar abierto reticulado homogéneo que tiene porosidad mayor que 75%, y que comprende poros de 1 a 10.000 micrómetros de diámetro e interconexiones de poro de hasta 100 micrómetros de diámetro, en donde el Polyhipe es un entramado para crecimiento multicelular en tres dimensiones, en el cual los poros e interconexiones del polímero están comprendidos en una pluralidad de zonas distintas o interpenetrantes que están adaptadas para regular el posicionamiento y la morfología celular, con lo cual el crecimiento de las células está constreñido en el interior y/o se extiende a través de zonas plurales de manera direccional y/o no direccional a fin de proporcionar una estructura de células múltiples para aplicaciones biomédicas.

20 En particular, la invención proporciona un método de fabricación de un entramado de polímero microcelular Polyhipe, comprendiendo el método los pasos de preparar una emulsión de fase interna alta, comprendiendo la emulsión una fase dispersa que comprende estireno, divinilbenceno y un agente tensioactivo, y caracterizado porque la fase continua comprende un iniciador y un polímero soluble en agua.

25 El polímero soluble se selecciona preferiblemente de carboximetilcelulosa o poli(óxido de etileno). Más preferiblemente, cuando el polímero soluble es carboximetilcelulosa, la carboximetilcelulosa tiene una masa molecular de 90.000 ó 250.000. Todavía más preferiblemente, cuando el polímero es poli(óxido de etileno) el poli(óxido de etileno) tiene una masa molecular de 200.000 ó 400.000. Todavía más preferiblemente, el polímero soluble está presente a un nivel de 1% p/p.

El método incluye opcionalmente el paso de incluir acrilato de dietilhexilo en la fase dispersa.

30 Convenientemente, el agente tensioactivo es Span 80™.

El polímero de acuerdo con la invención puede proporcionarse con características adicionales en la forma de retículos micro-capilares, nanoporos, propiedades de superficie, de modificación química, eléctricas o similares para propósitos especiales.

35 La invención proporciona por tanto materiales PHP útiles, cuyas muchas aplicaciones tienen gran importancia. Específicamente, la invención puede utilizarse como un módulo de órganos multicanal in vitro en el cual las células tienen que encontrarse bajo un cierto potencial químico y/o eléctrico, para expresarse y funcionar de este modo. El potencial químico y/o eléctrico será proporcionado por el contenido de los micro-canales. Este tipo de módulo es necesario en órganos como el hígado, el riñón y el páncreas. Módulos con micro-canales pueden utilizarse también como biorreactores selectivos en los cuales la expresión de las células está regulada por la presencia de un potencial químico y/o eléctrico impuesto por cada tipo de contenido de canal. La expresión de células bajo tipos diferentes de potencial y resistencia potencial puede utilizarse para obtener productos bioquímicos que pueden conducir a la comprensión de estos procesos y/o a la preparación de nuevas proteínas en aplicaciones de fármacos.

45 El uso de materiales PHP en la fabricación de productos bioquímicos no está limitado a las células animales cultivadas en un sistema de soporte con una arquitectura y condiciones fisiológicas preferidas. Tanto células vegetales como microorganismos tales como bacterias y virus pueden cultivarse también utilizando el material PHP. En este caso, la forma particulada del material PHP con poros abiertos puede utilizarse para proporcionar soporte para crecimiento de células, bacterias o virus. El material PHP particulado puede estar suspendido en un biomedio adecuado para que tenga lugar la reacción bioquímica. Sistemas de soporte monolíticos tales como los descritos en esta invención pueden utilizarse también para este propósito. Cuando se desea que crezcan virus sobre un soporte PHP, puede preferirse un material de poro pequeño, inferior a 1 micrómetro.

Preferiblemente, las zonas están adaptadas para crecimiento de tipos múltiples de células confinados independientemente dentro de y/o extendiéndose a lo largo de zonas múltiples respectivamente.

55 Los parámetros importantes que promueven el crecimiento celular son los tamaños de poro e interconexión y las características químicas y físicas de la superficie de soporte. En algunos casos, el crecimiento celular puede ser anisótropo (direccional) y por consiguiente puede ser necesario que los poros del soporte celular se encuentren en la forma de micro-canales con interconexiones para proporcionar comunicación entre las células y penetración de las

células. Las paredes de los microcanales pueden ser (bio)degradables a fin de que pueda conseguirse fusión celular subsiguiente después de la (bio)degradación.

Las aplicaciones biomédicas incluyen cualquier aplicación en la cual los materiales formen interfaz con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Por tanto, pueden contemplarse materiales para una gama de aplicaciones, por ejemplo la fabricación de lentes de contacto, rellenos dentales, implantes cocleares, soportes vasculares con inclusión de válvulas cardíacas y marcapasos cardíacos y parches dérmicos de suministro de fármacos, y análogos.

La referencia en esta memoria a un entramado hace alusión a un material poroso que proporciona soporte y permite una función de posicionamiento o soporte de cargas en el entramado en una etapa precoz a medida que el entramado dirige el crecimiento o asume la carga hasta que las células han crecido dentro de un entramado y han desarrollado matriz extracelular para lograr capacidad de soporte de cargas y con las cargas de soporte propiamente dichas.

El crecimiento celular puede ser de células que se introducen en el entramado o migran al entramado, por ejemplo en el caso en que se utilice un entramado para crecimiento sintético o se utilice para crecimiento de células naturales por migración de células del tejido circundante.

La referencia en esta memoria a Polyhipe hace alusión a cualquier polímero natural o sintético que comprenda poros e interconexiones como se definen anteriormente en esta memoria, obtenidos por polimerización de una emulsión de fase interna alta.

La referencia en esta memoria a poros e interconexiones en el polímero hace alusión a poros o células vacías con interconexiones de poro entre ellos, que pueden estar vacíos o pueden contener materiales disueltos o dispersados. Los poros e interconexiones se distinguen por su magnitud y dimensiones relativas como se define más adelante en esta memoria. La porosidad total del material es el espacio vacío combinado proporcionado por la suma de todos los poros e interconexiones.

La referencia de esta memoria a zonas dentro del polímero hace alusión a regiones distintas o interpenetrantes caracterizadas por la forma, localización, magnitud u otra propiedad de los poros e interconexiones comprendidos en la zona. Por ejemplo, se proporcionan una o más zonas en la superficie del polímero, dentro de su matriz en masa, en la interfase entre polímero y fase interna, entre poros y/o interconexiones adyacentes de forma o dimensión diferente o adaptados para crecimiento de diferentes tipos de células. Las zonas se distinguen por límites que pueden encontrarse entre o confinados dentro de poros y/o interconexiones adyacentes en zonas respectivas. Será necesario material de soporte de células con dos o más zonas distintas en las cuales los sitios de poros e interconexiones sean diferentes cuando se co-cultivan dos o más tipos de células.

Preferiblemente, el polímero de acuerdo con la invención es adecuado para crecimiento de tipos múltiples de células a fin de proporcionar una estructura de células multi-zona en la cual tipos de células selectivos están confinados al límite específico mientras que otros tipos de células crecen en toda la estructura a través de los límites presentados por el entramado. Por este medio, el entramado Polyhipe proporciona un sistema de células múltiples que se extiende por todo el entramado, incluyendo opcionalmente crecimiento intrainterconexión o intramicro-capilar y exhibiendo zonificación y opcionalmente interzonificación de células biológicas.

El polímero descrito en esta memoria es capaz además de estimular la zonificación natural de las células por migración en su interior, a su través y entre zonas que se han adaptado para migración preferencial de tipos de células deseados.

El polímero descrito en esta memoria puede obtenerse a partir de cualesquiera monómeros, oligómeros, macromonómeros, polímeros reactivos y mixturas de los mismos, naturales o sintéticos deseados que exhiben bio-compatibilidad. Los Polyhipes están disponibles comercialmente o pueden prepararse utilizando métodos como los descritos en US 5.071.747 y publicaciones de patente adicionales a las que se hace referencia en dicho lugar o como se describen más adelante en esta memoria.

El polímero Polyhipe genérico que está disponible comercialmente comprende Polyhipe polivinílico y está constituido por monómeros de la fase de aceite estireno, divinil-benceno (DVB) y agente tensioactivo (monooleato de sorbitán, Span 80), y puede encontrarse en forma rígida o flexible dependiendo de las proporciones reactivas de monómeros, y adicionalmente en forma flexible con inclusión de acrilato de 2-etilhexilo monómero, y en la fase acuosa una cantidad de persulfato de potasio como iniciador de fase acuosa.

El polímero descrito en esta memoria puede ser un polímero reticulado opcionalmente (bio)degradable, natural o sintético, soluble o insoluble, seleccionado preferiblemente de proteínas y celulosa, poliacrilamida, polivinilo en forma rígida o flexible, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), policaprolactona, poli(lactida/glicolida) y poliacrilimida.

Un Polyhipe disponible en el comercio tiene típicamente un diámetro de poro comprendido en el intervalo de 5-50 micrómetros.

El soporte de PHP puede tener un diámetro de poro comprendido en el intervalo de 0,5 ó 1-1000 micrómetros. Un orden de magnitud inferior preferido es 10 micrómetros, más preferiblemente 30, por ejemplo 50 micrómetros. Un orden de magnitud superior preferido es 300 micrómetros, más preferiblemente 200 micrómetros. Un Polyhipe de diámetro de poro particular puede obtenerse por métodos descritos más adelante en esta memoria, y puede tener cualquier ratio deseada de diámetro de interconexión a poro, por ejemplo en el intervalo de  $0 < d/D < 0,5$ , preferiblemente en el intervalo de  $0,1 < d/D < 0,5$  cuando el diámetro de poro es menor que aproximadamente 200 micrómetros. Las interconexiones pueden tener un diámetro comprendido en un orden de magnitud que llega hasta 100 micrómetros, preferiblemente 0,001 a 100 micrómetros, más preferiblemente 10-50 micrómetros. Pueden proporcionarse retículos extensos de micro-capilares alargados de diámetro tan pequeño como 10 micrómetros, estando separados estos capilares por el polímero microcelular. Una zona que comprende la interfase entre una pared capilar y el polímero en masa puede proporcionar una capa superficial de cualquier espesor deseado para crecimiento de células de cualquier tamaño deseado. Una interfase que tiene una capa superficial delgada del orden de 0,5-5 micrómetros es particularmente adecuada para el crecimiento de neuronas (células nerviosas) o células musculares en las cuales es importante la direccionalidad. La interfase que tiene un tamaño de poro más pequeño que la masa proporciona una zona ideal para crecimiento de células que formen un revestimiento, por ejemplo células que revisten los vasos sanguíneos o para crecimiento de células endoteliales en la superficie de la interfase.

La estructura de los poros de la presente invención se forma por cuatro mecanismos diferentes. Estos mecanismos se utilizan, a menudo en combinación, para ofrecer varias formas de arquitectura de soporte a fin de crear un modelo realístico para soporte de órganos. A continuación se describen cuatro estructuras de poro diferentes:

**Poros de Tipo-1 (poros básicos):** Esta es la estructura básica de poro cuyo tamaño se determina en la etapa de emulsificación de la formación de los PHP. Para ello, el tamaño de poro está determinado principalmente por la historia de deformación (flujo) de la emulsión. La integridad de estos poros se mantiene durante la polimerización y las interconexiones se forman en esta etapa. Dependiendo de la química de las fases aceitosa y acuosa, el volumen de fase u las condiciones de polimerización tales como temperatura y presión, el tamaño de interconexión puede controlarse dentro del intervalo de  $0 < d/D < 0,5$ .

**Poros Tipo-2 (poros de coalescencia):** Este tipo de arquitectura de poro se obtiene por la coalescencia controlada de los poros Tipo-1 durante la polimerización. Las gotitas de fase dispersa en la emulsión del PHP se fusionan por la adición de polímeros solubles en agua a la fase acuosa, o por adición de aceites ligeramente hidrófilos (tales como óxido de estireno) a la fase de aceite. El tamaño de la interconexión en este caso es el mismo que el de los poros Tipo-1 que forman una matriz que incorpora los poros unidos por coalescencia. Sin embargo, debido al hecho de que los poros fusionados son muy grandes en comparación con los poros básicos, la ratio  $d/D$  es muy pequeña.

**Poros Tipo-3 (micro-capilares):** Es posible obtener un retículo de micro-capilares dentro de los poros Tipo-1 o Tipo-2 (es decir soportados por estos poros) u obtener de hecho micro-capilares soportados por poros Tipo 1 con poros Tipo 2 formando las paredes de los capilares o viceversa. Estos micro-capilares se forman utilizando un molde construido especialmente, en el cual están insertadas varillas o fibras finas. La emulsión PHP se bombea en el molde y se lleva a cabo la polimerización. Después de la polimerización, se retiran estas inserciones sea por arrancamiento de las mismas (cuando la polimerización da como resultado contracción, o cuando las inserciones de polímero se hinchan primeramente durante la polimerización y se contraen subsiguientemente después de la polimerización o la eliminación del disolvente utilizado como carga para el monómero) o por disolución de las inserciones en ácido o en un disolvente adecuado. El diámetro mínimo de estos micro-capilares puede ser tan bajo como 10 micrómetros (utilizando fibras de vidrio, carbono o fibras polímeras). Pueden utilizarse fibras metálicas para obtener micro-capilares en el intervalo de 50-1000 micrómetros o mayores.

**Poros Tipo-4 (nanoporos):** Las paredes de los poros del PHP microporoso pueden hacerse nano-porosas utilizando una 'carga' adecuada en la fase de aceite de tal modo que, después de la polimerización, la carga o su forma resultante de la reacción pueda retirarse por extracción con disolvente. La carga puede ser aceite u otro monómero o macromonómero que no sufra polimerización o, si el monómero/macromonómero se polimeriza, el polímero resultante pueda ser extraído. La carga puede ser también otro polímero o polímero reactivo que se disuelva en el monómero o un aceite hidrocarbonado adecuado, así como sólidos de tamaño nanométrico tales como polvo de sílice o zeolita. Si el aceite de la 'carga' es muy soluble en el monómero así como el polímero reticulado resultante, el mismo creará poros muy finos después de la extracción. Si el polímero resultante no es soluble en el aceite de carga o si no se hincha, aquéllos formarán partículas submicrométricas unidas unas a otras por cierto número de cadenas de reticulación. Este retículo de partículas y el aceite de carga formarán un sistema co-continuo. Este método puede utilizarse para controlar la cantidad de nanoporosidad en el polímero microporoso. Se obtienen también nanoporos por utilización de polímeros que son solubles en el monómero. Estos polímeros pueden extraerse también después de la formación del polímero Polyhipe para crear nanoporos. Tales polímeros de carga, si no se extraen, pueden proporcionar resistencia adicional. Tales nanoporos permitirán la difusión de solutos de peso molecular bajo a través del soporte de órganos, dado que las paredes crearán una barrera para el transporte de estos solutos vitales. Dichos solutos incluyen oxígeno, dióxido de carbono, nutrientes, hormonas de crecimiento, electrolitos y

análogos. La presencia de los nanoporos puede ser útil también en la biodegradación controlada del soporte de órganos por degradación hidrolítica del polímero, dado que la superficie efectiva será muy alta.

Los tipos de poro pueden estar presentes en cualquier forma modular, por ejemplo de tipo camisa y tubo o tipo cúbico/polidéxico.

- 5 Preferiblemente, el tamaño de poro y el tamaño de interconexión se seleccionan de acuerdo con el tipo de célula a cultivar y el tipo de cultivo, es decir con o sin penetración, confinado a un límite o que atraviese los límites entre zonas. El tamaño de poro en las zonas destinadas al crecimiento de células a través de la zona es preferiblemente de un diámetro igual a 2-3 veces el diámetro de las células a cultivar, por ejemplo 2,5 veces el diámetro de las células. Sin quedar limitados por esta teoría, se cree que esta ratio de dimensiones es óptima para tipos de células, con inclusión de tipos de células cartilaginosas, en los cuales las células pueden crecer y prosperar, como se indica por la producción de colágeno. Por ejemplo, células de cartílago de 10 micrómetros de diámetro se cultivaron en poros que tenían un diámetro comprendido en el intervalo de 17-30 micrómetros, específicamente de 25 micrómetros.

- 15 El entramado del Polyhipe puede adaptarse para proporcionar una superficie deseada caracterizada por medio del recubrimiento superficial, utilizando materiales de recubrimiento introducidos *in situ* durante la polimerización o después de la polimerización. Pueden emplearse cualesquiera materiales conocidos utilizados típicamente para polímeros de recubrimientos para uso en cultivo de células, por ejemplo promotores del crecimiento celular tales como hidroxilapatito o fosfato tricálcico, que promueve también la biocompatibilidad, otros minerales, sílice, colágeno, hialurano, poli(óxido de etileno), carboximetil-celulosa (CMC), proteínas, polímeros orgánicos, partículas y análogos. El recubrimiento *in situ* proporciona un recubrimiento homogéneo en todo el entramado. El recubrimiento después de la polimerización, utilizando por ejemplo ablación láser, da como resultado un recubrimiento confinado a la superficie de la matriz en masa y puede ser un recubrimiento particulado.

- 25 El entramado Polyhipe puede construirse de cualesquiera materiales deseados como se definen anteriormente en esta memoria. Se ha encontrado que la deformación mecánica cíclica del soporte o la aplicación de un campo eléctrico pueden aumentar también la velocidad de crecimiento celular. En la mayoría de los casos, la biodegradabilidad del soporte no parece ser importante y por consiguiente el material soporte con las células de cultivo puede implantarse en el cuerpo animal sin temor de rechazo. No obstante, cuando se requiere fusión célula-célula, la (bio)degradabilidad llega a ser importante.

- 30 Por consiguiente, el polímero se construye preferiblemente de materiales resiliestamente deformables o elásticos o se hace resiliestamente deformable o elástico por medios adecuados. Materiales preferidos son por tanto termoplásticos que pueden deformarse de manera adecuada para influir en el crecimiento celular. Preferiblemente, un soporte Polyhipe como se define en esta memoria es adecuado para estrés y relajación repetidos por medio de deformación oscilatoria del entramado durante el crecimiento celular. Se ha encontrado que esto tiene efectos beneficiosos en la promoción de la velocidad de crecimiento celular.

- 35 El entramado Polyhipe como se define anteriormente en esta memoria puede ser eléctricamente conductor o puede hacerse eléctricamente conductor por medios conocidos por los cuales el mismo se hace adecuado para conducir una corriente eléctrica durante el crecimiento celular. Esta técnica es particularmente ventajosa para distinguir ciertos tipos de células y promover el crecimiento y la fusión de tipos particulares de células tales como neuronas y células musculares.

- 40 El entramado Polyhipe puede ser biodegradable o puede hacerse biodegradable por medios conocidos por los cuales el mismo se adapta para degradarse por contacto con cualquier agente deseado o por introducción en cualquier ambiente deseado, por ejemplo un agente o ambiente biológico específico. Preferiblemente, el entramado Polyhipe se adapta para degradación por hidrólisis o hidrólisis catalizada por enzimas de las cadenas de polímero y reticulación, o por la erosión del polímero. Por este medio, los entramados Polyhipe pueden utilizarse como entramado para soportar un sistema biológicamente activo durante el periodo de tiempo requerido para que dicho sistema se establezca por sí mismo y se vuelva autosoportante y se degrade después de ello sin efecto perjudicial alguno. Preferiblemente, se utiliza un entramado degradable para crecimiento de tipos de células que incluyen por ejemplo células musculares. Por este medio, un entramado se adapta a posicionamiento de tipos de células múltiples en zonas predeterminadas y para degradarse después de ello permitiendo que tenga lugar autofusión en ausencia del entramado interpuesto, con lo cual se crean microsistemas funcionales biológicamente activos.

- 45 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un entramado Polyhipe como se define anteriormente en esta memoria que comprende células múltiples caracterizadas por crecimiento en tres dimensiones como se define anteriormente en esta memoria en zonas de polímero como se definen también anteriormente en esta memoria.

- 55 Las células que incluye el entramado pueden comprender cualquiera de las propiedades definidas anteriormente en esta memoria.

Las células múltiples pueden ser cualquier tipo de célula deseado seleccionado de células humanas, animales y vegetales. Preferiblemente, las células son células humanas o animales y son representativas de tipos múltiples de células presentes en cualquier órgano, sistema o parte del cuerpo humano o animal. Las células se seleccionan

preferiblemente de tejido isótropo y células óseas presentes en cartílago, córnea, médula ósea y análogas, células anisótropas tales como células nerviosas, musculares, de los vasos sanguíneos, y análogas. El tipo de célula incluye por ejemplo fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, células de médula ósea, hepatocitos, cardiomiocitos, neuronas, mioblastos, macrófagos y células del endotelio microvascular.

5 Se describe también en esta memoria un sistema biológicamente activo que comprende un entramado de Polyhipe y células múltiples como se definen anteriormente en esta memoria, adaptado para proporcionar funcionamiento normal de las células asociado con un sistema natural biológicamente activo presente en el cuerpo humano o animal. Un sistema biológicamente activo puede comprender el entramado Polyhipe intacto o en estado  
10 parcialmente degradado como se define anteriormente en esta memoria adaptado para fusión o asimilación en un ambiente.

Se describe también un método para crecimiento de células múltiples en un entramado Polyhipe como se define anteriormente en esta memoria que comprende proporcionar células sobre o en el interior del entramado en un ambiente controlado y proporcionar un nutriente adecuado adaptado para crecimiento de manera conocida. El método puede incluir cualquier técnica para promoción del crecimiento, control posicional y análogos adaptados para  
15 proporcionar un sistema estructural como se define anteriormente en esta memoria.

Se describe también un entramado Polyhipe adaptado para crecimiento de células múltiples como se define anteriormente en esta memoria, que comprende células múltiples como se definen anteriormente en esta memoria o un sistema biológicamente activo como se define anteriormente en esta memoria para uso como implante *in vivo* en el cuerpo humano o animal o como módulos para estudios *in vitro* que mimetizan una parte del cuerpo humano o  
20 animal o para utilización en un ambiente de crecimiento para sistemas adicionales como se define adicionalmente en esta memoria, por ejemplo para el crecimiento de células orgánicas en el lado celular del módulo a fin de simular órganos.

Se describe también un módulo de soporte de órganos que comprende un módulo cúbico o poliédrico de canales entretnejidos pero no de interconexión sumergidos en PHP. El módulo es adecuado para crecimiento de células de  
25 órganos específicos en el PHP y/o los canales. Algunas células pueden estar en contacto con un microcanal específico, y todas las células serán capaces de comunicación intercelular.

Pueden producirse órganos *in vitro* utilizando las interconexiones micro-capilares del entramado como se define anteriormente en esta memoria para circulación de nutrientes y eliminación de productos de desecho al tiempo que se cultivan células en los poros de la masa y adicional o subsiguientemente cuando se requiere crecimiento anisótropo de células, por ejemplo para mimetizar sistemas cardiovasculares y análogos, empleando circulación de  
30 nutrientes y productos de desecho eliminables a través de los poros de la masa del entramado microporoso al tiempo que se cultivan las células en las interconexiones micro-capilares. Es una ventaja particular que esto permite el crecimiento y mantiene el funcionamiento celular durante periodos prolongados. El uso de los entramados y sistemas que se definen anteriormente en esta memoria como órganos *in vitro* puede aprovecharse para testado de  
35 productos farmacéuticos y cualesquiera sustancias a introducir en el cuerpo humano o animal, para ingeniería genética, para estudio de los mecanismos asociados con enfermedades y análogos, en condiciones controladas, etcétera. Esto es particularmente ventajoso en la eliminación de la necesidad de tests con animales. Los módulos *in vitro* como se definen anteriormente en esta memoria para tipos específicos de células y aplicaciones múltiples pueden proporcionarse y pueden asociarse con instrumentación para proporcionar las condiciones fisiológicas  
40 necesarias.

El módulo es adecuado para cultivo de células de órganos específicos en el PHP y/o los canales. Algunas células pueden estar en contacto con un microcanal específico, y todas las células serán capaces de comunicación intercelular.

Con objeto de mimetizar el ambiente natural de las células en un órgano, tienen que proporcionarse cierto número de medios disponibles para el funcionamiento fisiológicamente correcto de las células. Estos medios disponibles  
45 pueden resumirse como:

1. micro-capilares de suministro de sangre o nutrientes;
2. canales de recogida y expresión de las células;
3. estimulación neural;
4. soporte microcelular para el co-cultivo de células de soporte;
5. biocompatibilidad y biodegradabilidad controlada; y
6. características mecánicas, químicas y eléctricas de soporte controladas.

Es posible repartir una serie de canales micro-capilares que están separados por material de soporte celular (masa del soporte de órganos) a fin de facilitar (1)-(3). En un sistema de soporte de órganos de este tipo, las células están  
55 dentro de unos pocos centenares de micrómetros de estos micro-capilares. En cada conjunto de retículos capilares, así como en la masa, puede regularse la presión media de tal manera que los productos de expresión de las células se recojan en el conjunto de capilares diseñado y se recuperen subsiguientemente. Las neuronas pueden cultivarse en el conjunto de micro-capilares diseñado y estimularse eléctricamente por un microchip externo. Dado que la expresión celular se ve afectada por los estados externos de estrés (estrés física tal como deformación cíclica y

temperatura, estrés química tal como fármaco/toxina en sangre/nutriente, estimulación eléctrica por los nervios) es posible obtener expresiones celulares diferentes dependiendo del estrés externo que pueden controlarse muy exactamente en un órgano *in vitro*. *In vivo*, el intervalo y la duración de los estados de estrés externos son limitados y existe siempre interferencia de las otras células. Por tanto, los órganos *in vitro* con medios fisiológicos disponibles son útiles para extender el alcance de la respuesta celular a los estados de estrés externos. A este respecto, los órganos *in vitro* pueden considerarse como Reactores Biomédicos, lo cual permite la síntesis de nuevas proteínas y la comprensión de los procesos de enfermedad.

Puede utilizarse para siembra un conjunto de capilares, a fin de que las células no tengan que desplazarse una larga distancia para ocupar el espacio disponible. Después de la siembra, estos micro-capilares pueden utilizarse para otros propósitos.

Es posible diseñar un sistema de soporte de órganos que permita el co-cultivo de células de soporte en proximidad estrecha a las células de los órganos principales. Pueden co-extruirse emulsiones PHP con tamaños de poro e interconexión diferentes en una configuración deseada (es decir, concéntricamente o en paralelo). Como se ha encontrado en esta invención, las células no penetran si los tamaños de poro e interconexión son demasiado grandes o demasiado pequeños con respecto al tamaño de la célula. Por tanto, cada tipo de célula podrá seleccionar la estructura de poro óptima para soporte y crecimiento.

La estimulación eléctrica de las células nerviosas en crecimiento en un micro-capilar puede conseguirse por recubrimiento de los micro-capilares con polímeros conductores. En ausencia de cualquier retículo neural para estimulación eléctrica, pueden crearse campos eléctricos controlados dentro del sistema de soporte por utilización de un retículo de fibras de carbono como conductores.

Debe apreciarse que la invención se deriva del descubrimiento de que los entramados Polyhipe como se definen anteriormente en esta memoria pueden proporcionarse con dimensiones y diámetros de poro controlados en zonas como las definidas anteriormente en esta memoria, de tal modo que por ejemplo un tipo de célula penetra en el entramado y un segundo tipo de célula puede crecer en la superficie. Esto permite el crecimiento y posicionamiento controlado de las células de tal manera que cree una estructura de células múltiples que está adaptada para cooperar a fin de proporcionar actividad biológica.

Se proporciona un proceso para la preparación de polímeros Polyhipe microcelulares naturales o sintéticos como se definen anteriormente en esta memoria, que comprende en una primera etapa la formación de una emulsión de fase interna alta (HIPE) de fase dispersa en una fase continua, en donde la fase dispersa puede estar vacía o puede contener materiales disueltos o dispersados, y están presentes monómeros, oligómeros y/o pre-polímeros en la fase continua, homogeneización y polimerización de los mismos, por medio de introducción de la fase dispersa en la primera etapa por dosificación controlada en la fase continua con mezcladura controlada a temperatura controlada a fin de formar una emulsión, y homogeneización subsiguiente durante un periodo controlado bajo deformación y polimerización controladas, a temperatura y presión controladas.

El proceso hace posible la obtención de una amplia gama de tamaños de poro por control de la técnica de procesamiento y las condiciones de composición y en particular como se define anteriormente en esta memoria para obtener micro-poros de los Tipos 1-4. Los tamaños de poro se obtienen a grandes rasgos en tres grupos: éstos son; tamaño de poro pequeño: 1-10  $\mu\text{m}$ ; tamaño de poro grande: 11-200  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro muy grande: 201-10000  $\mu\text{m}$ .

Se obtienen emulsiones de tamaño de poro muy pequeño (que se aproxima a 0,5  $\mu\text{m}$ ) utilizando flujos de velocidad de deformación muy alta en los cuales el flujo es predominantemente extensional y la temperatura de emulsificación es lo más baja posible. Se obtienen emulsiones de tamaño de poro grande (que se aproxima a 200  $\mu\text{m}$ ) a temperaturas altas e inmediatamente por encima de la velocidad crítica de deformación por debajo de la cual la emulsión se invertirá total o parcialmente, por ejemplo para formar un sistema de tipo aceite en agua. La velocidad de deformación crítica puede determinarse haciendo variar, por ejemplo, la velocidad de adición o velocidad de deformación durante la mezcladura para un sistema dado. Estas emulsiones deberían procesarse también en un tiempo breve utilizando predominantemente flujos de cizallamiento.

Se obtienen emulsiones de poro muy grande (que se aproxima a 10.000  $\mu\text{m}$ ) por el método de coalescencia controlada de los poros durante la polimerización. Existen dos métodos para conseguir coalescencia controlada: 1) por adición a la fase acuosa (dispersa) de una cantidad conocida de polímero soluble en agua o 2) por adición de solutos 'carga' a la fase continua de aceite. En ambos métodos, son importantes la concentración y el tipo de estos aditivos. Si las concentraciones son bajas, estos aditivos darán como resultado polímeros Polyhipe en el intervalo de 1-200  $\mu\text{m}$  con algunas propiedades deseadas. Si la concentración es superior a determinado valor, comienzan a formarse poros de coalescencia. En este caso, el tamaño de poro viene dictado por el tamaño de los poros antes del comienzo de la coalescencia, la temperatura de polimerización y la concentración, el peso molecular y el tipo de aditivo.

La emulsión puede obtenerse a partir de cualesquiera fases inmiscibles deseadas que formen una fase continua y una fase dispersa, preferiblemente a partir de fases acuosa y no acuosa, más preferiblemente fases acuosa y aceitosa. La emulsión obtenida puede ser una emulsión de agua en aceite o emulsión de aceite en agua.

El proceso de acuerdo con la invención puede utilizarse para la preparación de cualesquiera polímeros deseados como se definen anteriormente en esta memoria.

5 Sorprendentemente, se ha encontrado que por medio de dosificación controlada de la fase dispersa en la fase continua, es posible conseguir la emulsión deseada. En un mezclador de lotes, la dosificación de la fase dispersa se conduce preferentemente desde el fondo del mezclador, utilizando puntos de entrada simples o múltiples. La alimentación con entradas múltiples daba como resultado emulsiones de poros mayores. Si la velocidad de dosificación era muy rápida, la mezcladura creada por el chorro emergente de fase acuosa era demasiado intensa y por esta razón el tamaño de poro de la emulsión disminuye. Por tanto, esta combinación de puntos de alimentación múltiples con una dosificación relativamente prolongada creaba una emulsión de poros grandes. Una vez  
10 completada la dosificación, la emulsión debería homogeneizarse, pero si el periodo de homogeneización era largo, el tamaño de poro disminuía.

La mezcladura controlada como se define anteriormente en esta memoria puede ser crítica o extensa. La mezcladura crítica es una mezcladura suficiente para causar la dispersión de la fase acuosa en la fase de aceite sin inversión de fases. Se obtiene una mezcladura crítica por el uso de un campo de mezcla homogéneo por lo cual el  
15 tamaño de poro es sustancialmente uniforme evitando la rotura de la emulsión y la inversión de fases.

La mezcladura puede realizarse por cualquier medio adecuado para proporcionar un campo de mezcla homogéneo sustancialmente en todo el volumen de las dos fases, y preferiblemente se realiza por medio de paletas múltiples, chorros múltiples y sistemas de mezcladura análogos.

20 De modo sorprendente, se ha encontrado que, contrariamente a la doctrina de US 5.071.747, la consecución de una emulsión estable con diámetro de poro grande se obtiene por minimización de la intensidad de mezcladura. De acuerdo con la invención, se ha encontrado que por medio de dosificación, mezcladura homogénea y medios análogos, puede obtenerse una emulsión estable evitándose la necesidad de mezcladura intensa.

La dosificación, la emulsificación y la homogeneización pueden conducirse a cualquier temperatura adecuada dependiendo del tamaño de poro en el polímero Polyhipe final. Si el tamaño de poro deseado es grande, la  
25 temperatura preferida es alta, pero sin embargo, inferior al punto de ebullición de la fase que hierva a temperatura más baja. Una fase acuosa como la fase que hierva a la temperatura más baja, hierva aproximadamente a 100°C. Se ha encontrado que el proceso de la invención que emplea una temperatura de emulsificación de 60°C o mayor da como resultado la obtención de polímeros que tienen un tamaño de poro superior a 60 micrómetros. El aumento de la temperatura de emulsificación por encima de 60°C da como resultado un aumento espectacular en el tamaño de  
30 poro en una magnitud mayor que la alcanzada para un intervalo similar de temperatura por debajo de 60°C.

La temperatura máxima de emulsificación puede ser mayor que la temperatura normal de ebullición de la fase de punto de ebullición más bajo, por ejemplo la fase de punto de ebullición más bajo puede incluir cualquier componente adecuado adaptado para elevar el punto de ebullición. Preferiblemente, la fase acuosa incluye un  
35 electrólito que es estable a 100°C y es potencialmente inerte. Por este medio, el proceso se lleva a cabo preferiblemente con el uso de una temperatura de homogeneización comprendida en el intervalo de 60-150°C, más preferiblemente 80-140°C, y muy preferiblemente 80-120°C.

La emulsificación y la polimerización subsiguiente pueden llevarse a cabo a temperaturas superiores al punto de ebullición normal de los materiales de la fase acuosa o continua, por aumento de la presión por encima de la atmosférica utilizando equipo de proceso continuo cerrado.

40 El proceso puede llevarse a cabo con la utilización de iniciadores de fase acuosos o aceitosos adicionales, agentes de reticulación, cargas y análogos, y se prefiere que éstos sean estables a la temperatura de operación máxima como se define anteriormente en esta memoria. La selección de iniciadores, agentes de reticulación y análogos se hace con referencia a la viscosidad aceptable de las fases para emulsificación y homogeneización. Puede ser aceptable reducir la cantidad de agente de reticulación requerida por el uso de una proporción de pre-polímeros y  
45 pre-polímeros parcialmente reticulados, opcionalmente con el uso de una carga de la fase de aceite adecuada para aumentar el volumen de la fase de aceite y reducir la viscosidad efectiva.

Preferiblemente, el proceso de la invención se caracteriza por el uso de un iniciador en la fase de aceite, junto con o en lugar de un iniciador de la fase acuosa como se conoce en la técnica.

50 Preferiblemente, el proceso se lleva a cabo con el uso de cargas de la fase de aceite permitiendo la operación a temperatura de emulsificación alta y con el uso de una cantidad mínima de agente de reticulación. Esto tiene la ventaja adicional de que la carga de la fase de aceite tal como un producto hidrocarbonado de punto de ebullición alto puede eliminarse por lixiviación después de la polimerización, creando nanoporos y aumentando el tamaño de las interconexiones. Los electrólitos pueden ser por ejemplo cloruro de calcio o minerales tales como hidroxipatito.

55 Pueden emplearse iniciadores de la fase acuosa para operación a temperaturas inferiores, que incluyen persulfato de sodio o potasio.

Para operación a temperatura elevada por encima de 80°C, se utilizan preferiblemente iniciadores de la fase de aceite, por ejemplo, 1,1-azobis(ciclohexanocarbonitrilo).

Un agente de reticulación puede ser por ejemplo divinilbenceno (DVB). Si se requiere que el Polyhipe sea biodegradable, pueden obtenerse reticulaciones hidrolizables. Estos agentes de reticulación son diacrilato de etileno, N,N'-dialil-tartardiamida, N,N-(1,2-dihidroxietano)-bis-acrilamida, y N,N',N"-trialil-amida cítrica. Sin embargo, en este caso de reticuladores biodegradables, el polímero propiamente dicho debería ser biodegradable. Estos polímeros son poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), poli-ε-caprolactama y poliacrilimida.

Cuando son necesarios polímeros solubles en agua para formar la estructura microcelular, los mismos tienen que estar reticulados. En el caso de tales polímeros, se disuelve el monómero (tal como acrilamida) en agua y se forma una emulsión de HIPE dosificando esta solución de monómero en un líquido hidrocarbonado tal como hexano o tolueno en presencia de agente tensioactivo, iniciador y reticulador adecuados.

Las proteínas y la celulosa pueden formar también estructuras microcelulares. En este caso, estos materiales junto con un emulsionante adecuado se disuelven en una fase acuosa adecuada (agua para proteínas y reactivo de Schweitzer,  $\text{Cu}(\text{NH}_3)_4(\text{OH})_2$  para celulosa) y se dosifican en un líquido hidrocarbonado para formar un HIPE acuoso continuo. La reticulación se consigue por inmersión del HIPE en una solución de aldehído glutárico (para proteínas) o solución ácida (celulosa).

La carga de la fase de aceite puede ser cualquier hidrocarburo de punto de ebullición alto, otro monómero, o macromonómero, polímero reactivo o inerte, partículas sólidas, o sus combinaciones.

El proceso puede incluir la introducción de cualquier modificador adecuado como se define anteriormente en esta memoria antes o después de la polimerización. Por ejemplo, pueden introducirse minerales tales como hidroxiapatito en la fase acuosa dispersa y dosificarse en la fase continua como se define anteriormente en esta memoria. Alternativamente, se emplea una etapa de modificación después de la polimerización, que puede tener simplemente la forma de eliminación del agente tensioactivo, el electrólito y el monómero sin reaccionar, recubrimiento, polimerización ulterior o reacción en la superficie existente del polímero. Agentes modificadores y técnicas de modificación se muestran en la técnica.

La polimerización se lleva a cabo en condiciones conocidas de tiempo y temperatura para el monómero, oligómero y/o prepolímero respectivo a polimerizar, como se conoce en la técnica.

Se proporciona un polímero microcelular Polyhipe natural o sintético en la forma de un material reticulado homogéneo de celdillas abiertas que tiene una porosidad superior a 75% que comprende poros e interconexiones de poro formadas por polimerización de una emulsión de fase interna alta (HIPE) como se define anteriormente en esta memoria en donde el diámetro medio de poro es superior a 50 micrómetros. Preferiblemente, el diámetro medio de poro es superior a 100 micrómetros, más preferiblemente superior a 150 micrómetros, y se selecciona de modo que sea adecuado para la aplicación deseada del polímero. Se contemplan diámetros de poro de hasta 10.000 micrómetros. Los diámetros de interconexión son como se define anteriormente en esta memoria.

Se proporciona un polímero Polyhipe como se define anteriormente en esta memoria que tiene un tamaño medio de poro como se define anteriormente en esta memoria comprendido en el intervalo de 1-10.000 micrómetros, en donde el polímero se modifica durante la polimerización del mismo o después de la polimerización para ser eléctricamente conductor, degradable, o que comprenda mineral distribuido por toda la matriz o como un recubrimiento superficial.

Se proporciona un aparato para la preparación de un polímero que comprende una vasija de mezcladura adaptada para contener la fase continua que tiene entradas múltiples para la introducción por dosificación de la fase dispersa como se define anteriormente en esta memoria, y que comprende medios para mezcladura homogénea como se define anteriormente en esta memoria, comprendiendo medios de elevación y regulación de la temperatura.

Se proporciona un método para fabricación de un módulo de soporte de órganos como se define anteriormente en esta memoria. El método emplea una o más etapas como se definen anteriormente en esta memoria para crear poros de los Tipos 1-4.

La invención se ilustra a continuación de manera no limitante con referencia a los ejemplos y figuras que siguen, en donde:

Las Figuras 1a-2b son esquemáticas, y una sección transversal de sistemas de soporte de órganos que emplean la invención.

#### **Ejemplo A - Preparación de Polyhipe, utilizando un aparato de acuerdo con la invención**

La preparación de la emulsión se llevó a cabo en un mezclador de lotes a partir de una fase de aceite y una fase acuosa, dosificadas a una velocidad predeterminada mientras la emulsión se agitaba a una velocidad de rotación constante. La velocidad de dosificación, la velocidad de deformación, y la velocidad de mezcladura se predeterminaron en función del volumen de las fases respectivas, el diámetro del mezclador de lotes y de los impulsores, la velocidad de rotación de los impulsores y el tiempo de homogeneización.

Con obtento de eliminar las diferencias en la eficiencia de las diferentes condiciones de mezcladura, se caracterizó la mezcladura por:

Velocidad de dosificación

$$R_D = \frac{V_A}{t_D}$$

5 Velocidad de deformación durante la dosificación

$$R_E = V_A / (t_D V_0)$$

Velocidad de mezcladura

$$R_M = D_1 \Omega / D_0$$

donde:

- 10  $V_A$  = volumen de fase acuosa añadido a lo largo de un periodo de tiempo  $T_D$   
 $V_0$  = volumen de la fase de aceite introducido en el mezclador de lotes  
 $D_1$  = diámetro de los impulsores  
 $D_0$  = diámetro del mezclador de lotes  
 $\Omega$  = velocidad de rotación

15 Se define también  $t_H$  como el tiempo de homogeneización, y  $t_T$  como tiempo total de mezcladura:

$$t_T = t_D + t_H$$

Después de la preparación de las emulsiones en una serie de condiciones dada como se describe en cada uno de los ejemplos que siguen, se dejó que la emulsión se polimerizara a 60°C durante 8 horas. Las muestras se modificaron ulteriormente como se describe en los ejemplos que siguen.

20 Los tamaños de poro e interconexión se determinaron empleando un microscopio electrónico de barrido, con utilización de muestras concienzudamente secadas y lavadas.

**Ejemplo A1 - El efecto de las condiciones de operación sobre el tamaño de poros e interconexiones**

25 La fase de aceite contenía 78% de estireno, 8% de monómero DVB y agente de reticulación y 14% de agente tensioactivo monooleato de sorbitán Span 80, mientras que la fase acuosa contenía 1% de persulfato de potasio. Se utilizaron dos impulsores de paletas planas (8 cm de diámetro y 1,4 cm de anchura) en un tanque de mezcla de 8,5 cm de diámetro. La separación de los impulsores era 1 cm. Se pusieron 25 ml de la fase de aceite en el fondo del tanque y se dosificaron 225 ml de fase acuosa utilizando 16 puntos de alimentación. La temperatura de la fase acuosa estaba comprendida entre -1,0 y 80°C.

Tabla 1 - El efecto de las condiciones operativas sobre el tamaño de poros e interconexiones

Temp (grados C)	Tamaño de Poro (D) (µm)	Tamaño de Interconexión (d) (µm)	Tiempo(s) de dosificación	Tiempo(s) de homogeneización	d/D
6	34	9	40	60	0,26
25	37	14	40	60	0,38
60	65	22	40	60	0,33
80	141	37	40	60	0,26
25	102	25	40	20	0,25
25	72	21	30	20	0,29
25	67	22	25	20	0,33
25	148	43	60	20	0,29

30 **Ejemplo A2 - El efecto de los polímeros solubles en agua sobre el tamaño de poros e interconexiones en la coalescencia de poro controlado**

35 Se prepararon emulsiones utilizando 78% de estireno, 8% de DVB y 14% de Span 80 como la fase de aceite. La fase acuosa contenía 1% de persulfato de potasio y cantidades variables de polímeros solubles en agua, carboximetil-celulosa sódica (CMC) o poli(óxido de etileno) (PEO). La emulsificación se realiza a 25°C, el volumen

de la fase acuosa es 85% y la fase acuosa se suministra a través de una sola entrada. Las condiciones de proceso eran:  $t_D = t_H = 600$  segundos,  $R_D = 0,70$  ml/s,  $R_E = 0,0067$  s<sup>-1</sup>, y  $R_M = 4,7$  s<sup>-1</sup>.

Tabla 2 - El efecto de los polímeros solubles en agua sobre el tamaño de poro en la coalescencia de poro controlado

Peso Molecular Relativo	Concentración de Polímero Soluble en Agua % en peso de la fase acuosa	Tamaño de Poro ( $\mu\text{m}$ )
Control	0	18
Carboximetil-celulosa sódica (CMC)		
90.000	0,5	22
90.000	1,0	260
250.000	1,0	1200
Poli(óxido de etileno) (PEO)		
200.000	1,0	420
400.000	1,0	4300

5 **Ejemplo A3 - Recubrimiento superficial in situ con hidroxiapatito**

Se prepararon emulsiones utilizando: (A1) 78% de estireno, 8% de DVB y 14% de Span 80 o (A2): 15% estireno, 60% acrilato de 2-etilhexilo, 10% de DVB y 15% de Span 80. La fase acuosa contenía, o bien (B1): 1% de persulfato de potasio o (B2): 1% de persulfato de potasio, 0,5% de hidroxiapatito (HA) y 15% de ácido fosfórico, que se utiliza para disolver el hidroxiapatito (HA). La emulsificación se lleva a cabo a 25°C, con un volumen de fase acuosa de 85% y suministrándose la fase acuosa a través de una sola entrada. Las condiciones de procesamiento eran  $t_D = t_H = 600$  segundos,  $R_D = 0,83$  ml/s,  $R_M = 4,7$  s<sup>-1</sup>, y  $R_E = 0,0067$  s<sup>-1</sup>. Después de la emulsificación y la polimerización, las muestras que contenían hidroxiapatito se impregnaron con NaOH 1 M para precipitar el hidroxiapatito. Después de la precipitación, las muestras se lavaron en agua para retener pH = 7 e IPA y se examinaron respecto a su estructura.

15 Tabla 3 - El efecto del hidroxiapatito sobre el tamaño de poros e interconexiones

Descripción	Composiciones de las Fases de Aceite y Acuosa			
	A1B1 (PHP Rígido)	A1: B2 (PHP/HA Rígido)	A2: B1 (PHP Elástico)	A2: B2 (PHP/HA Elástico):
Tamaño de Poro D ( $\mu\text{m}$ )	22	38	9	17
Tamaño de Interconexión d ( $\mu\text{m}$ )	2	11	1,5	6
d/D	0,09	0,29	0,17	0,35

Las muestras con las composiciones (A<sub>1</sub>; B<sub>1</sub>) y (A<sub>1</sub>; B<sub>2</sub>) se examinan bajo SEM y el análisis elemental de su superficie indicaba una distribución uniforme del hidroxiapatito (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>) como se muestra en la Tabla 4.

20 Se hace referencia a la fase de aceite que contiene solamente estireno como PHP rígido, y cuando la fase de aceite contiene acrilato de 2-metilhexilo, se hace referencia a la composición resultante como PHP elástico.

Tabla 4 - Análisis elemental de la superficie de fractura de dos polímeros Polyhipe con composiciones (A<sub>1</sub>; B<sub>1</sub>) y (A<sub>1</sub>; B<sub>2</sub>).

Componente	PHP sin modificar (A <sub>1</sub> :B <sub>1</sub> ) - %p	PHP recubierto con hidroxiapatito (A <sub>1</sub> :B <sub>2</sub> ) %p
Carbono	82	74
Oxígeno	12	21,4
Calcio	-	3,2
Fósforo	-	1,4

Se prefiere este recubrimiento in situ de Polyhipe con hidroxiapatito, dado que la impregnación posterior a la polimerización del material en solución de hidroxiapatito y la precipitación subsiguiente parecían formar cristales de hidroxiapatito grandes pero localizados en el interior de los poros del Polyhipe.

**Ejemplo A4 - Efecto de la composición de la fase de aceite sobre el tamaño de poros e interconexiones**

- 5 Se preparó una emulsión como se ha descrito arriba, que incluía 0,5% de iniciador de la fase de aceite, 1,1'-azobis(ciclohexanocarbonitrilo). El volumen total y la viscosidad se mantuvieron sustancialmente inalterados. La emulsión se procesó y se polimerizó como se ha descrito arriba pero utilizando tiempos y velocidades de mezcladura convencionales como se conocen en la técnica (velocidad de dosificación  $R_D = 0,71$  ml/s, velocidad de mezcladura,  $R_M = 4,7$  s<sup>-1</sup>, tiempo de mezcladura  $t_D = t_H = 600$  s), y se evaluaron las propiedades de los materiales. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Muestra	Tamaño de Poro, D (μm)	Tamaño de Hueco, d (μm)	d/D
Polyhipe de Control	15,8	2,3	0,15
Polyhipe con iniciador	22,7	4	0,18

**Ejemplo A5 - Efecto del iniciador soluble en la fase de aceite sobre el Polyhipe modificado con hidroxilapatito**

- 15 Se preparó una emulsión utilizando solución de hidroxilapatito al 0,5% en peso (pH = 2,5 ajustado con ácido fosfórico) sin iniciador de fase acuosa alguno. La fase de aceite contenía 77,5% de estireno, 8% de DVB, 14% de Span 80 y 0,5% de azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador de la fase de aceite.

Todas las condiciones experimentales restantes eran las mismas que en el Ejemplo 3. En la Tabla 6, se compara el Polyhipe modificado con hidroxilapatito con el material correspondiente del Ejemplo 3 (es decir, PHP/HA rígido).

20

Tabla 6

Muestra	Tamaño de Poro D (μm)	Tamaño de Interconexión d (μm)	Ratio d/D
HA Rígido	38	11	0,29
HA Rígido iniciado con AIBN	30	12	0,40

La tabla anterior indica que la presencia de iniciador de la fase de aceite no afecta sustancialmente a los tamaños de poros e interconexiones. Sin embargo, el análisis elemental de las superficies del Polyhipe utilizando EDAX (análisis de energía dispersiva con rayos X) muestra que la presencia de HA es más pronunciada si se utiliza iniciador de la fase de aceite. Estos resultados se muestran en la Tabla 7.

25

Tabla 7

Componente	Análisis global de Polyhipe modificado con HA con AIBN	Análisis global de Polyhipe modificado con HA
Carbono	63,09	74
Oxígeno	22,49	21
Fósforo	2,98	2
Calcio	9,70	3

La concentración de iones calcio es mayor que para el control que no contenía AIBN.

**Ejemplo A6 - Efecto de las partículas de sílice en las fases acuosa y aceitosa**

Se incorporó sílice hidrófila (Aerosil 380, tamaño de partícula 7 nm) en la fase acuosa mientras que se incorporó sílice hidrófoba (Aerosil R812, tamaño de partícula 20 nm) en la fase de aceite. Estas muestras de sílice se obtuvieron de Degussa, Alemania. En cada caso, la carga de sílice era 0,5, 1,0, 2,0, ó 5,0% en peso. El volumen de fase de la fase acuosa era 90% y las condiciones de procesamiento eran: velocidad de dosificación  $R_D = 0,375$  ml/s; velocidad de mezclado  $R_M = 4,7$  s<sup>-1</sup>, tiempo de mezclado  $t_D = 600$  s,  $t_H = 1200$  s. La fase de aceite contenía inicialmente 15% de estireno, 62% de acrilato de 2-etilhexilo, 8% de DVB, y 15% de Span 80. Se añadió sílice hidrófoba a esta mixtura a varios niveles. La fase acuosa contenía 1% de persulfato de potasio. Cuando se utilizó sílice hidrófila en la fase acuosa, no existía sílice alguna en la fase de aceite y la composición original de la fase de aceite se utilizó como anteriormente. Los resultados se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Efecto de la sílice sobre el tamaño de poros e interconexiones del polímero Polyhipe cuando la sílice está presente únicamente en la fase de aceite.

Sílice en la fase de aceite (% p)	9	0,5	1,0	2,0	5,0
Tamaño de poro, D (µm)	10,7	14,3	21,9	37,2	60,7
Tamaño de interconexión, d (µm)	4,0	3,2	2,9	3,2	3,43
d/D	0,37	6,22	0,13	0,09	0,06

Tabla 9. Efecto de la sílice sobre el tamaño de poros e interconexiones del polímero Polyhipe cuando la sílice está presente únicamente en la fase acuosa.

Sílice en la fase acuosa (% p)	0	0,5	1,0	2,0	5,0
Tamaño de poro, D (µm)	10,7	17,6	28,9	36,2	Formación de poros de coalescencia
Tamaño de interconexión, d (µm)	4,0	3,6	23,4	1,9	
d/D	0,37	0,21	0,12	0,05	

**Ejemplo B7 - Crecimiento de células múltiples en Polyhipe**

Se obtuvieron condrocitos (obtenidos de la articulación metacarpofalángica de bovino), de células osteoblastos humanas (HOB) y células fibroblastos 3T3 de rata. Se cortaron en discos dos muestras de Polyhipe, sin y con HA, se lavaron y se esterilizaron concienzudamente. Se utilizaron como control discos Thermanox. Los discos se impregnaron en el medio de cultivo de células respectivo durante 24 horas y se pusieron en placas de pocillos. Se sembraron cada una de las células 3T3, HOB y condrocitos en los discos a densidades de 100.000, 100.000 y 500.000 células por ml respectivamente. Las placas se incubaron luego a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> durante hasta 3 semanas. Las muestras se examinaron después de 1, 7, 14 y 21 días por SEM y por histología.

**Resultados**

Puede verse que las células 3T3 que se cultivaron en el Polyhipe rígido se han multiplicado rápidamente, estando presente el día 1 una capa confluyente en ambos tipos de Polyhipe. Esta capa se mantenía durante toda la duración del experimento. Por histología pudo verse que no había penetración alguna, en algunas muestras el día 7 y en todas las muestras el día 14, la capa de células había comenzado a abandonar la superficie del Polyhipe.

Las células HOB exhibían una morfología muy esparcida el día 1 bajo SEM, puentando las células las interconexiones en la superficie del Polyhipe, opuestamente al crecimiento en el interior de las interconexiones. El día 7, todas las muestras tenían una capa confluyente en la superficie. En la histología se observó que había una ligera penetración, únicamente hasta la profundidad de un poro en las muestras que contenían HA. La capa se mantenía fijada con seguridad a la superficie durante toda la duración del experimento.

Los condrocitos en los momentos de 1 y 7 días se adherían a los discos de Polyhipe y exhibían una morfología redondeada en ambos tipos de Polyhipe, comparada al control de Thermanox® en el que las células se habían esparcido y habían adquirido apariencia de fibroblastos. El día 14, había signos de células más planas, y el día 21 había capas confluentes sobre algunas muestras. Podía observarse que las células en el Polyhipe HA se aplanaban en los momentos iniciales comparadas con el Polyhipe sin modificar. En la histología se observó que del día 5 en adelante se registraba penetración en ambos Polyhipes, y estaban presentes células dentro de la estructura 3D; sin

embargo, el Polyhipe HA tenía mayor penetración y visualmente parecía que contenía más células. Las células que habían penetrado en el Polyhipe sin modificar eran menores en número, pero retenían su forma redondeada.

Por los resultados de la tinción con Safinin O puede verse que estaban presentes condrocitos sanos tanto en el centro como en la periferia de la matriz de polímero. Había células viables que secretaban GAG tanto en el polímero como en la periferia.

Los estudios de la velocidad de crecimiento de los condrocitos (obtenidos por análisis de DNA) indican que los Polyhipes modificados con hidroxilapatito da lugar a un crecimiento significativamente más rápido comparados con los Polyhipes sin modificar, como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10

Tipo de Ensayo	Lisis celular (mg DNA/ml)	
Tiempo (día)	PHP	HA-PHP
1	3,1	3,2
5	3,6	4,4
10	3,6	9,5

**Ejemplo B8 - Efecto del Tamaño de Poro sobre el Crecimiento Celular**

Se produjeron 6 tipos de Polímeros Polyhipe estireno/acrilato de 2-etilhexilo (que contenían recubrimiento de hidroxilapatito) con tamaño medio de poro de 8, 17, 24, 31, 34 y 89  $\mu\text{m}$ . El tamaño de las interconexiones era similar en todos los casos. Estas muestras se sembraron luego con condrocitos y se observó el efecto del tamaño de poro. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Efecto del tamaño de poro de los PHP sobre la penetración de células y la producción de colágeno II después de 21 días de cultivo de las células

Tamaño de poro, D ( $\mu\text{m}$ )	8	17	24	31	45	89
Tamaño de interconexión, d ( $\mu\text{m}$ )	3	5	6	6	7	7
Profundidad de penetración ( $\mu\text{m}$ )	17	508	570	367	67	45
Producción relativa de colágeno II	23	48	52	42	12	9

La producción de colágeno tipo II es una indicación de la función celular fisiológica correcta. Este ejemplo indica que, para los condrocitos que tienen tamaño de célula de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ , el tamaño óptimo de poro es aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ . Si el tamaño de poro es demasiado pequeño, las células no pueden penetrar en el polímero, y si el tamaño de poro es demasiado grande, la morfología de las células cambia de redondeada a plana y con aspecto de fibroblastos. Estas células fibroblásticas proliferan rápidamente y forman una capa en la superficie en lugar de penetrar en el polímero.

Otra medida de la producción de matriz extracelular es el rendimiento de glucosaminoglucano (GAG). La concentración de GAG se determinó por un ensayo colorimétrico. El efecto del tamaño de poro y en la producción de GAG se evaluó utilizando los estudios de cultivo de células resumidos en la Tabla 10. Los estudios de producción de GAG se compararon también con el Plástico de Cultivo de Tejidos (TCP). Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Efectos del tamaño de poro sobre la producción de GAG después de 21 días de cultivo de células. Los resultados se comparan también con los estudios de cultivo de células utilizando plástico de cultivo de tejidos (TCP).

Tamaño de poro, D ( $\mu\text{m}$ )	8	17	24	31	45	89	TCP
Tamaño de interconexión, d ( $\mu\text{m}$ )	3	5	6	6	7	7	0
Producción relativa de GAG	192	720	784	528	384	400	352

**Ejemplo B9 - Actividad de Macrófagos en el Polímero Polyhipe Sulfonado**

La biocompatibilidad de los materiales puede testarse por exposición de los mismos a macrófagos. La respuesta de los macrófagos a un material se evalúa por: a) cambios morfológicos a macrófagos, b) producción de peróxido de hidrógeno por los macrófagos y c) producción de beta-glucuronidasa por los macrófagos. Los macrófagos son esféricos *in vitro* y cualquier desviación de esta respuesta es una respuesta negativa. La producción excesiva de peróxido de hidrógeno y beta-glucuronidasa son también respuestas negativas.

Se produce un Polímero Polyhipe estireno/acrilato de 2-etilhexilo. Algo de este material está sulfonado (el grado de sulfonación es 12%) y se neutraliza subsiguientemente utilizando hidróxido de sodio. Se siembran macrófagos sobre estos polímeros y se evalúan su morfología y sus capacidades de producción de peróxido de hidrógeno y beta-glucuronidasa al cabo de 6 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Efecto del sustrato sobre la actividad de los macrófagos

Tipo de Sustrato	Morfología	Producción relativa de peróxido de hidrógeno	Producción relativa de glucuronidasa
PHP	Redonda	370	47
PHPsulfonado	Plana	975	684
TCP*	Redonda	295	93

\* TCP = Plástico de Cultivo de Tejidos

La Tabla 13 indica que el PHP sulfonado produce un nivel muy alto de actividad negativa y por consiguiente tales polímeros pueden utilizarse como estándar negativo en el cual la actividad se reduce a medida que disminuye el grado de sulfonación.

**Ejemplo C - Fabricación de un Sistema de Soporte de Órganos**

Las Figuras 1a-2b ilustran configuraciones de capilares y canales en micro- y macroescala en módulos Polyhipe obtenidos por el método del Ejemplo C.

En un sistema de soporte de células, puede suponerse que únicamente están presentes poros Tipo-1 (poros básicos), probablemente con un conjunto de micro-capilares que proporcionan una siembra de células efectiva y actúan subsiguientemente como canales de nutrientes. En este caso, estos canales micro-capilares no precisan ser muy compactos y pueden tener grandes diámetros que se aproximan a 500 micrómetros. Tales sistemas de soporte de células pueden tener el tipo de configuración de camisa y tubo, y pueden construirse de modo que tengan una sección transversal cilíndrica o cuadrada o rectangular. Esta configuración es similar a los haces de fibras huecas, excepto que el lado de la envoltura constituye el PHP en masa y la interfase micro-capilar/PHP en masa es muy fina (0,5-5 micrómetros).

En un sistema de soporte de órganos existe más de un tipo de micro-capilar presente. En un cartucho de soporte de órganos cúbico o poliédrico, las caras opuestas pueden estar conectadas unas a otras con micro-capilares. En el caso más simple, se ilustra un cartucho de soporte de órganos cúbico o cuboidal con tres tipos de microcanales en las Figuras 1a, b. En la Figura 1a, se muestra una representación en 3D de los micro-capilares (únicamente se ilustran 3 tipos de capilares), mientras que en la Figura 1b se ilustra la sección transversal mostrando todos los capilares y PHP en la masa. En este caso, los canales se designan como canales A, canales B, y canales C.

Se utiliza el procedimiento siguiente para obtener un retículo en 3D de fibras en un molde que se llena subsiguientemente con la emulsión de PHP y se polimeriza posteriormente. Sin embargo, este procedimiento no es único sino que tiene por objeto ilustrar la técnica de fabricación de los sistemas de soporte de órganos *in vitro*.

1. Hebras de varillas o fibras metálicas del diámetro deseado se intercalan de dos hojas de polímero utilizando una prensa caliente o dos laminadores (calandrias). Las fibras o varillas metálicas son paralelas unas a otras y crearán finalmente los canales A. Estos paneles intercalados se cortan a un tamaño deseado y se estampan opcionalmente con una matriz para formar huecos que alojarán finalmente las varillas metálicas que conducen a la formación de los canales B. De este modo se producen varios de estos paneles intercalados.

2. Se repite el procedimiento anterior utilizando varillas o fibras metálicas del diámetro deseado a fin de obtener los canales C. Si los diámetros de los canales A y C tuvieran que ser iguales, no hay necesidad alguna de tener paneles intercalados fibras/varillas separados.

3. Estos paneles se extienden en un molde unos encima de otros con dos tipos de espaciadores metálicos delgados entre ellos. El primer tipo de espaciador asegura las fibras en su lugar, mientras que el segundo tipo puede retirarse cuando el ensamblaje de fibras se comprime en la dirección de los canales B. La orientación de las fibras que formarán los canales A y C son perpendiculares unas a otras. El molde contiene ya varillas

metálicas que formarán los canales B. El grosor de los espaciadores metálicos delgados determina la separación de los canales A y C.

5 4. Estos paneles se tensan de manera segura y se introducen en un horno que permite el tensado de las capas fibra/varilla a medida que la temperatura del horno se eleva gradualmente por encima del punto de fusión del polímero utilizado en los paneles intercalados. La temperatura se eleva ulteriormente a fin de eliminar completamente por combustión el polímero dejando un retículo 3D de fibras/varillas.

10 5. Estas fibras/varillas pueden requerir recubrimiento superficial con polímero a fin de crear una interfase deseada capilar/masa. Por ejemplo, estas fibras/varillas de plantilla pueden recubrirse con polímeros hidrófobos para obtener estructura de poros cerrados en la interfase cuando se producen polímeros PHP basados en estireno. Si las fibras/varillas de la plantilla están recubiertas con polímeros solubles en agua tales como poli(óxido de etileno), pueden obtenerse poros de Tipo-2 en la interfase. Cuando los metales no están recubiertos, se obtiene en la interfase estructura de poros abiertos.

15 6. El molde se llena con la emulsión lentamente bajo vibración a fin de conseguir un llenado completo. El molde se comprime ulteriormente en la dirección de los canales B por eliminación de los espaciadores metálicos Tipo-2, permitiendo así el escape del exceso de emulsión. La viscosidad de la emulsión debería ser lo más baja posible, y la emulsión debería recircularse durante el llenado.

7. Después del llenado del molde y la polimerización, se retiran las varillas de la plantilla y las fibras se disuelven en ácido, dejando así al descubierto los canales micro-capilares.

20 Después de la fabricación del cartucho de soporte de órganos, se lava el mismo en agua y se neutraliza, y subsiguientemente se lava con etanol para eliminar cualquier monómero residual, lavándose de nuevo con agua y secándose antes de ser esterilizado listo para uso como soporte de órganos *in vitro*.

25 En los módulos cuboidales de las Figuras 1a-2b, existen tres tipos de canales A, B, C. Éstos se muestran en las Figuras 2a y 2b, que conectan las caras de un cubo, indicadas en la Figura 2a como A-A', B-B' y C-C', respectivamente. Los canales A pueden ser portadores de sangre (o plasma, o nutrientes); los canales B pueden utilizarse para transportar los productos de la célula (expresión de la célula, productos metabólicos), mientras que los canales C pueden utilizarse para cultivar células anisótropas tales como células nerviosas o musculares. Utilizando un módulo cuboidal con 8 caras y por consiguiente 4 tipos de micro-canales, pueden cultivarse también células musculares junto con células nerviosas, proporcionando todavía la recogida de sangre y productos de la célula. El espacio entre los micro-canales estará ocupado con una célula de órgano específico o tejido conectivo o  
30 tejido o estimulante.

Cada canal puede ser de un diámetro diferente y densidad de compactación diferente, y los mismos pueden estar modificados independientemente en la superficie (por ejemplo pueden hacerse eléctricamente conductores, o tener porosidad interfacial o tamaño de poro diferente, o estructura química diferente). En lugar de cultivar células nerviosas, podría ser suficiente tener, por ejemplo, fibras de carbono presentes en estos canales a fin de  
35 proporcionar conductividad eléctrica.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de fabricación de un entramado de polímero Polyhipe microcelular, comprendiendo el método los pasos de preparar una emulsión de fase interna alta, comprendiendo la emulsión una fase dispersa que comprende estireno, divinilbenceno y un agente tensioactivo, y **caracterizado porque** la fase continua comprende un iniciador y un polímero soluble en agua.
- 5 2. Un método de fabricación de un entramado de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el polímero soluble se selecciona de carboximetilcelulosa o poli(óxido de etileno).
3. Un método de fabricación de un entramado de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual la carboximetilcelulosa tiene una masa molecular de 90.000.
- 10 4. Un método de fabricación de un entramado de acuerdo con la reivindicación 2, en el cual la carboximetilcelulosa tiene un peso molecular de 250.000.
5. Un método de fabricación de un entramado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual el poli(óxido de etileno) tiene una masa molecular de 200.000.
- 15 6. Un método de fabricación de un entramado de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual el poli(óxido de etileno) tiene una masa molecular de 400.000.
7. Un método de fabricación de un entramado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual la fase dispersa incluye acrilato de dietilhexilo.
8. Un método de fabricación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el cual el polímero soluble está presente en una proporción de 1% p/p.
- 20 9. Un método de fabricación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el cual el agente tensioactivo es Span 80™.
10. Un entramado de polímero microcelular Polyhipe que puede obtenerse por el proceso de las reivindicaciones 1-9.

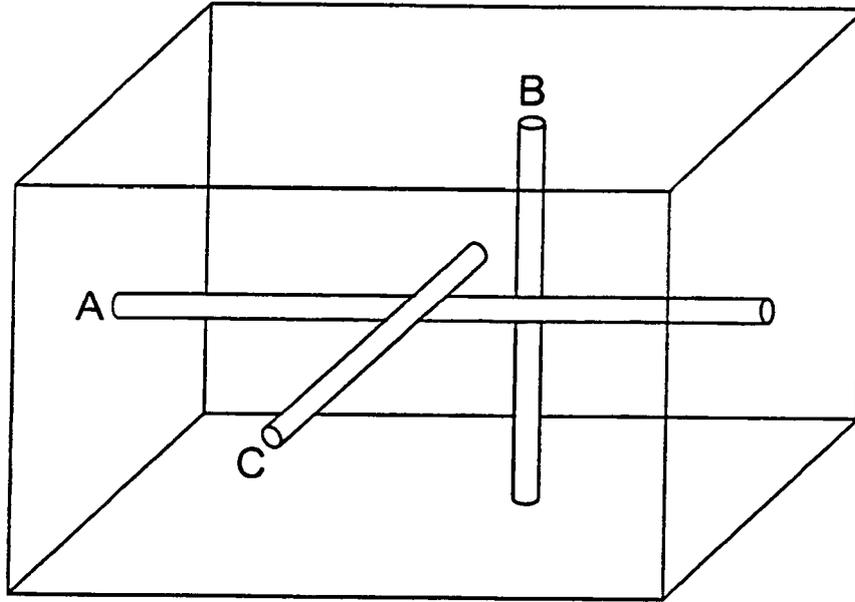
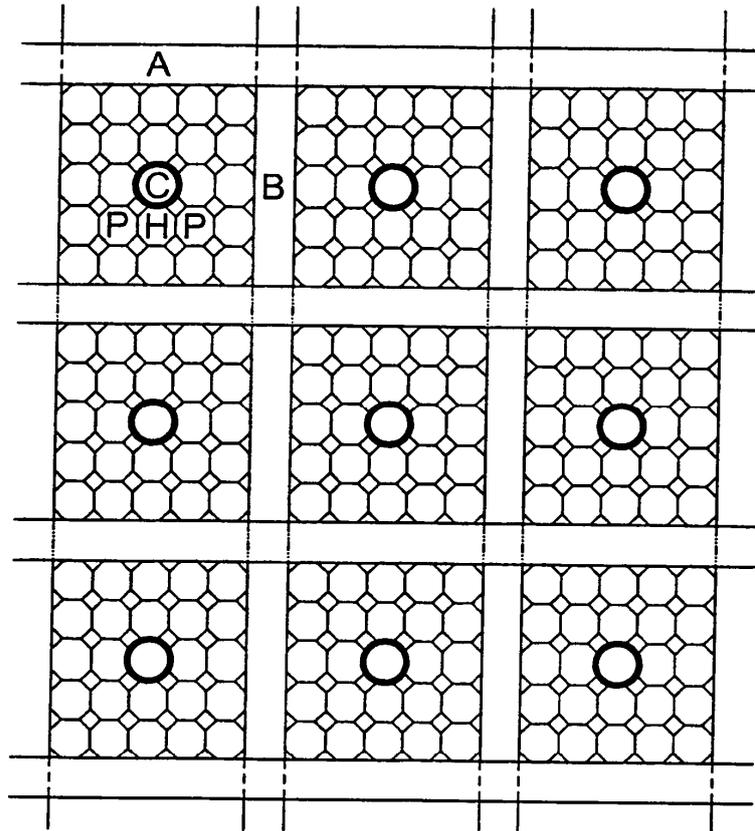
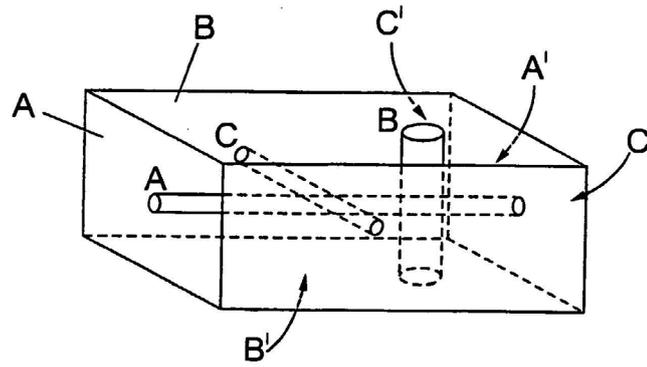


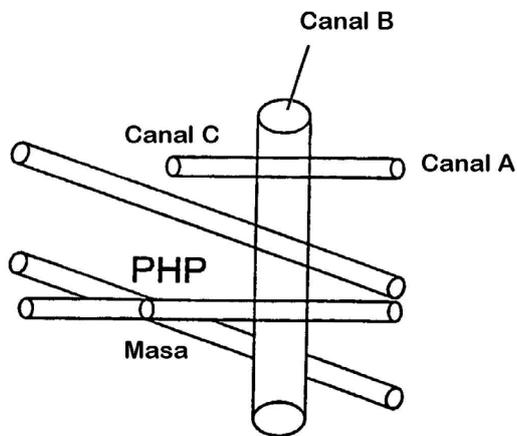
Fig. 1a



*Fig. 1b*



*Fig. 2a*



*Fig. 2b*