

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 710**

51 Int. Cl.:

A61L 27/56 (2006.01)

A61L 27/44 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04799839 .8**

96 Fecha de presentación: **19.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1693075**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.08.2006**

54 Título: **Sustrato para regeneración tisular**

30 Prioridad:

21.11.2003 JP 2003391935

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.12.2012

73 Titular/es:

**TEIJIN LIMITED (100.0%)
6-7, MINAMIHONMACHI 1-CHOME CHUO-KU
OSAKA-SHI OSAKA 541-0054, JP**

72 Inventor/es:

**FUKUHIRA, YUKAKO;
ITO, MASAYA;
KANEKO, HIROAKI;
SUMI, YOSHIHIKO;
SHIMOMURA, MASATSUGU y
TANAKA, MASARU**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 393 710 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

Sustrato para regeneración tisular

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al uso de una película que tiene una estructura en panal compuesta principalmente de un compuesto polimérico y un sustrato de regeneración tisular fosfolípido, así como a un complejo de los mismos con células.

Antecedentes de la técnica

10 Se ha puesto mucha atención en el hecho de que la actividad celular puede controlarse por los patrones finos y las estructuras tridimensionales de superficies de materiales, y tales técnicas han sido el objeto de numerosos informes recientes en el campo de ingeniería de tejidos. El desarrollo de tecnologías para formar estructuras finas con el tamaño óptimo, estructura de superficie y creación espacial para células ha llegado a desempeñar un papel principal en la consecución de un diseño más libre de tejidos biológicos.

15 Por ejemplo, el tejido cartilaginoso no contiene vasos sanguíneos, nervios o conductos linfáticos y por lo tanto tiene poca capacidad regenerativa. En consecuencia, los sitios dañados no se regeneran y pierden su función original. Las afecciones clínicas conocidas que implican pérdida de cartílago articular incluyen enfermedades tales como osteoartritis y artritis reumatoide, y daño de cartílago articular inducido por lesión. Se realiza cirugía de reemplazo de cartílago artificial para la reparación de dicho cartílago escasamente regenerable, pero debido a que el cartílago artificial incluye metales y polímeros moleculares altos éste es susceptible de abrasión, disgregación, infección y similares. Otra estrategia empleada es el trasplante de condrocitos, pero una vez dañado el cartílago solamente
20 puede regenerarse como fibrocartílago, que es bioquímica y dinámicamente inferior al cartílago hialino original. Por lo tanto, una técnica de ingeniería tisular reciente que se está investigando de forma activa es el trasplante de condrocitos utilizando un armazón con una estructura tridimensional para mantener las propiedades de las células.

25 Una técnica tal se desvela en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada N° 2001-293081, como un material de trasplante de cartílago que tiene condrocitos incluidos en un gel de colágeno. Sin embargo, si el colágeno no se manipula a temperatura baja éste gelifica y ya no puede mezclarse con células, mientras que su resistencia de gel también es débil.

30 La Memoria Descriptiva de Patente de Estados Unidos N° 6.197.061 desvela un procedimiento para cultivar condrocitos en un gel de alginato. Sin embargo, el gel de alginato se descompone después de su uso para crecimiento celular y por lo tanto en la práctica no realiza ninguna función como un armazón para inyección de condrocitos en áreas afectadas.

Además, la Publicación de Patente Japonesa No Examinada N° 2001-157574 desvela el sustrato de cultivo celular de una película con estructura en panal que comprende un polímero biodegradable y un polímero anfipático, pero esta publicación no se refiere en ningún lugar a un sustrato de cultivo celular y condrocitos en una película biodegradable con una estructura en panal que comprenda un fosfolípido.

35 Además, la Publicación de Patente Japonesa No Examinada N° 2002-335949 describe un procedimiento para formar un agregado tridimensional de tejido hepático o tejido miocárdico usando el sustrato de cultivo celular de una película con estructura en panal que comprende un polímero biodegradable y un polímero anfipático, pero este procedimiento implica formar una estructura multicapa cultivando células en ambos lados del sustrato de cultivo celular, mientras que las células en sí mismas no crecen en una estructura tridimensional.

Divulgación de la invención

40 Es un objeto de la presente invención proporcionar una película para su uso como un sustrato de regeneración tisular. Es otro objeto de la invención proporcionar un complejo del sustrato de regeneración tisular con células.

Otros objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la explicación detallada a continuación.

45 De acuerdo con la presente invención, los objetos y ventajas anteriormente mencionados se consiguen, en primer lugar, mediante el uso de una película con una estructura en panal que tiene un diámetro interno de cavidad medio de 0,1 a 20 μm , compuesto principalmente de un compuesto polimérico y un fosfolípido como un sustrato de regeneración tisular.

50 Los objetos y ventajas de la invención anteriormente mencionados se consiguen también, en segundo lugar, mediante el uso de una película con una estructura en panal que tiene un diámetro interno de cavidad medio de 0,1 a 20 μm , compuesto principalmente de un compuesto polimérico y un fosfolípido, como un sustrato de regeneración tisular en el que las células se mantienen en el sustrato de regeneración, formando de este modo un complejo de regeneración tisular. El sustrato de regeneración tisular es un sustrato adecuado para la regeneración, en particular, de tejido cartilaginoso. Utilizando una película con una estructura en panal altamente biocompatible de acuerdo con

la invención, la película en sí misma, aunque sea bidimensional, actúa como un sustrato de regeneración de tejido cartilaginoso que es similar a un armazón tridimensional, por lo que los condrocitos pueden cultivarse en el sustrato de regeneración tisular para producir un complejo de sustrato de regeneración tisular/celular con tejido cartilaginoso cultivado en una estructura tridimensional.

- 5 También pueden cultivarse células distintas de condrocitos en la película en panel desvelada por la presente invención para formar eficazmente tejido en una estructura tridimensional.

El sustrato de regeneración tisular puede proporcionar un espacio para crecimiento celular satisfactorio de células distintas de condrocitos. Como ejemplo, el uso de una película en panel que comprende un compuesto polimérico y un fosfolípido como se desvela por la presente invención pueden proporcionar un espacio más satisfactorio para excelente actividad metabólica de células cultivadas en la misma, del que es posible con una película que tenga una estructura en panel del tipo indicado en la técnica anterior.

Debido a que la superficie del sustrato de regeneración tisular tiene una estructura en panel, tiene menos área de adhesión celular que una película lisa, y por lo tanto se inhibe el crecimiento celular, se produce un sustrato y se muestra el mismo efecto que con un armazón tridimensional. El sustrato de regeneración tisular tiene una estructura bidimensional y por lo tanto es fácilmente manejable para siembra celular más sencilla y similares, mientras que la densidad celular mantenida es alta para permitir que el cultivo celular se lleve a cabo de forma sencilla y eficaz.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un dibujo esquemático de un laminado de complejos que comprende un sustrato de regeneración de cartilago y condrocitos cultivados en el sustrato, de acuerdo con la invención.

La Fig. 2 muestra un ejemplo de la forma de un complejo que comprende un sustrato de regeneración de cartilago y condrocitos cultivados en el sustrato, de acuerdo con la invención.

La Fig. 3 es una microfotografía electrónica que muestra la película con una estructura en panel obtenida en el Ejemplo 1.

La Fig. 4 muestra los resultados de la medición de la actividad metabólica para el Ejemplo 2 y Ejemplo Comparativo 2.

La Fig. 5 es una microfotografía electrónica que muestra la película con una estructura en panel obtenida en el Ejemplo Comparativo 1.

La Fig. 6 es una microfotografía óptica que muestra el complejo de condrocitos y un sustrato de regeneración de tejido cartilaginoso obtenido en el Ejemplo 3.

La Figura 7 es una microfotografía óptica que muestra el complejo de condrocitos y un sustrato de regeneración de tejido cartilaginoso obtenido en el Ejemplo Comparativo 7.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle. Los ejemplos y la explicación a continuación sirven exclusivamente para ilustrar la invención, y no se pretende que restrinjan el alcance de la invención de ningún modo. Todos los otros modos de la invención que quedan dentro de lo esencial de la invención también están implicados dentro de su alcance.

El compuesto polimérico que compone la película usada en la invención es preferentemente un polímero biodegradable. Los polímeros biodegradables preferidos desde el punto de vista de la solubilidad en disolventes orgánicos incluyen ácido poliláctico, copolímero de ácido poliláctico-ácido poliglicólico, ácido polihidroxibutírico, policaprolactona, poliésteres alifáticos biodegradables tales como polietileno adipato y polibutileno adipato y policarbonatos alifáticos tales como polibutileno carbonato y polietileno carbonato; éstos también pueden ser copolímeros o mezclas. Se prefieren particularmente entre éstos ácido poliláctico, copolímero de ácido poliláctico-ácido poliglicólico, policaprolactona y copolímero de ácido poliláctico-policaprolactona.

Como ejemplos de compuestos poliméricos distintos de polímeros biodegradables pueden mencionarse poliestireno y polímeros basados en vinilo tales como alcohol polivinílico, poli(etileno-covinilo acetato) y poli(hidroxietil metacrilato), y sus copolímeros, y polímeros condensados tales como poli(carbonatos), poli(uretanos), nailon y similares, así como sus copolímeros.

La fuente del fosfolípido que compone la película usada en la invención no es importante, y el fosfolípido puede ser uno extraído de tejido animal o uno producido por síntesis artificial. El fosfolípido es preferentemente al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y sus derivados. Es más preferentemente una fosfatidiletanolamina, y aun más preferentemente L- α -fosfatidiletanolamina-dioleoil.

El uso de un fosfolípido permite control del ángulo de contacto de la película de estructura en panel ajustando la concentración del fosfolípido, para fabricar una película de estructura en panel más satisfactoria que tenga un ángulo de contacto más deseable para adhesión celular.

La relación de composición del compuesto polimérico y el fosfolípido es preferentemente 1:1-1000:1 en peso. Es más preferentemente 10:1-500:1 y aún más preferentemente 50:1-200:1.

La película también puede contener otros componentes tales como suavizantes o fármacos siempre que el objeto de la invención no se obstaculice.

5 Puesto que la fabricación de una película con una estructura en panal como se usa en la invención requiere formación de gotas finas de agua en la solución polimérica, el disolvente orgánico usado debe ser no acuoso. Como ejemplos de tales disolventes pueden mencionarse disolventes orgánicos basados en halógenos tales como cloroformo y cloruro de metileno, hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno y xileno, ésteres tales como etil acetato y butil acetato, cetonas no acuosas tales como metil isobutil cetona y disulfuro de carbono. Estos disolventes orgánicos pueden usarse solos, o puede combinarse una pluralidad de disolventes para su uso como un disolvente mezclado.

15 La concentración de la solución que incluye el compuesto polimérico y fosfolípido disuelto en el disolvente es preferentemente 0,01-10% en peso y más preferentemente 0,05-5% en peso. No se prefiere una concentración de polímero de menos de 0,01% en peso debido a que la película obtenida carecerá de fuerza dinámica. Una concentración de más del 10% en peso puede ser demasiado alta para conseguir una estructura en panal adecuada. La relación de composición del compuesto polimérico y fosfolípido es preferentemente 1:1-1000:1, más preferentemente 10:1-500:1 y aún más preferentemente 50:1-200:1. Si el fosfolípido está presente en menos de 1/1000 con respecto al compuesto polimérico, puede no obtenerse una estructura en panal homogénea. Si la relación en peso es mayor de 1:1, la película puede no ser autoportable, mientras que el coste aumentará, lo que conduce a desventajas económicas.

20 La solución de polímero-disolvente orgánico se vierte en una base para formar una película con una estructura en panal, en la que la base usada puede ser un material inorgánico tal como vidrio, metal o una oblea de silicio, un polímero con resistencia a disolvente orgánico excelente tal como polipropileno, polietileno o polietercetona, o un líquido tal como agua, parafina líquida o poliéter líquido. Cuando se usa agua como la base, se utiliza preferentemente la propiedad autoportable de la estructura en panal para permitir que la estructura se retire fácilmente como un cuerpo separado de la base.

25 Se cree que el mecanismo por el que se forma la estructura en panal es el siguiente. Cuando el disolvente orgánico hidrófobo se evapora, este consume calor latente y provoca una reducción de la temperatura en la superficie de la película moldeada, dando como resultado coalescencia y adhesión de gotas finas de agua en la superficie de la solución polimérica. La acción de la parte hidrófila de la solución polimérica reduce la tensión superficial entre el agua y el disolvente orgánico hidrófobo, y de este modo las gotas finas de agua se funden hacia una masa sencilla y se estabilizan. A medida que el disolvente se evapora, se ordenan gotas líquidas formadas de manera hexagonal en su empaquetamiento más estrecho y finalmente el agua escapa dejando el polímero ordenado en forma de una figura de panal regular. El ambiente para la preparación de la película preferentemente tiene una humedad relativa en el intervalo de 10-95%. A menos del 10%, la condensación de las gotas de agua en la película moldeada será insuficiente, y a más del 95% será más difícil mantener el control ambiental. El diámetro interno de cada una de las cavidades del panal de la estructura en panal obtenida en este procedimiento es de 0,1 a 100 µm. El diámetro interno de la cavidad adecuado para cultivo celular es preferentemente 0,1-20 µm y aún más preferentemente 1-15 µm. La película con una estructura en panal producida en este procedimiento tiene la estructura en panal en su superficie, y si el grosor de la película es suficientemente grande la superficie posterior en contacto con la base será plana sin orificios perforados. Si el grosor de la película es menor que los tamaños de las gotas de agua, la película resultante tendrá orificios perforados. Puede seleccionarse una película perforada o no perforada según sea apropiado para el uso pretendido.

30 El sustrato de regeneración tisular es un sustrato particularmente adecuado para regeneración de tejido cartilaginoso. Se describirá ahora un procedimiento de cultivo celular en una película con una estructura en panal y un procedimiento para la producción de un complejo de regeneración tisular usando condrocitos como un modelo ejemplar.

35 Los condrocitos usados para su cultivo en la película con una estructura en panal pueden obtenerse de cartílago hialino, fibrocartílago o cartílago elástico. Para reparación ideal del trasplante, se prefiere usar condrocitos articulares obtenidos de cartílagos de articulaciones que no están bajo una carga pesada. Las células se preparan por extracción a partir de tejido seguido de retirada del tejido conectivo, etc. por protocolos ordinarios. También puede llevarse a cabo cultivo primario mediante un protocolo ordinario para precultivo de las células.

40 Cuando los condrocitos se siembran en la película con una estructura en panal usada en la presente invención, la película con la estructura en panal puede formarse en una placa para su uso directo, o la película con la estructura en panal puede insertarse en un recipiente de cultivo celular, dependiendo de cuál sea el procedimiento más conveniente.

45 Después de sembrar las células en la película con la estructura en panal, se añade solución de cultivo y puede llevarse a cabo crecimiento de cultivo en un medio adecuado en, por ejemplo, un incubador a 37 °C, CO₂ 5%.

La ventaja de usar una película con una estructura en panal en la invención es que la estructura de superficie en panal da como resultado un área de adhesión celular más pequeña que una película lisa, de modo que se inhibe el crecimiento celular, se produce un sustrato y se muestra el mismo efecto que con un armazón tridimensional. Por lo tanto, usando una película con una estructura en panal es posible evitar cambios en la morfología celular que se producen con el crecimiento repetido, y en el caso de los condrocitos, por ejemplo, es posible reducir la proporción de fibrocondrocitos productores de sustrato de cartílago bajo en el complejo para regeneración de tejido cartilaginoso. Como resultado, puede conseguirse reconstrucción de tejido cartilaginoso por condrocitos de forma más eficaz.

Además, el uso de una película con una estructura en panal no perforada evita la filtración de la suspensión celular de siembra de la película, dando como resultado un aumento de la densidad de las células conservadas en comparación con una esponja tridimensional o similares, y permitiendo la regeneración tisular rápida y eficaz. Cuando el complejo que retiene células se usa en su forma de película es posible conseguir la regeneración de tejido delgado, pero también pueden laminarse complejos que retienen células como se muestra en la Fig. 1. En este caso, el grosor del tejido regenerado puede ajustarse por el número de capas de películas con estructura en panal laminadas. Puesto que las células se siembran en cada una de las películas de estructura en panal, la densidad de las células en las películas de estructura en panal laminadas es la misma que en un complejo con una película sencilla y el trasplante de las mismas al cuerpo permite que tenga lugar regeneración tisular satisfactoria. Dependiendo del sitio de regeneración tisular, puede incluso ser posible la laminación de películas con diferentes densidades celulares. Además, el tipo de células retenidas en las películas de estructura en panal puede variarse de modo que su laminación forme una estructura que se aproxime a la hallada en el cuerpo.

Como alternativa, puede enrollarse una película de estructura en panal cubierta con células en un rodillo como se muestra en la Fig. 2, para formar una figura cilíndrica. En este caso, el tamaño del tejido regenerado puede ajustarse por la altura del rodillo y el número de vueltas del rodillo.

La densidad de siembra de células para cultivar en la película de estructura en panal diferirá dependiendo del tipo celular, y para condrocitos, por ejemplo, la densidad de siembra preferida es una que favorezca la producción de sustrato cartilaginoso frente al crecimiento celular. Una densidad de siembra celular tal permitirá que los condrocitos produzcan abundantemente el sustrato cartilaginoso desde el inicio del cultivo, para obtener de forma eficaz un sustrato cartilaginoso en la cantidad necesaria para regeneración de cartílago.

Por ejemplo, desde el punto de vista de mantener de forma más eficaz la morfología celular y producir sustrato cartilaginoso, la densidad de siembra de condrocitos para la invención está en el intervalo de 5×10^4 células/ml a 1×10^6 células/ml, y preferentemente en el intervalo de 1×10^5 células/ml a 8×10^5 células/ml, para siembra de células en un área de 400 mm^2 , por ejemplo.

Si la densidad de siembra celular es menor que este intervalo, se favorecerá el crecimiento de condrocitos frente a la producción de sustrato cartilaginoso, y la morfología celular puede alterarse o puede no producirse eficazmente una cantidad suficiente de sustrato cartilaginoso. Si la densidad de siembra celular es mayor que este intervalo, la actividad celular de los condrocitos puede no mantenerse de forma suficiente y la producción de sustrato cartilaginoso puede ser inadecuada.

El tiempo de cultivo celular puede estar en un intervalo de 1 día a 4 semanas. El intervalo es preferentemente de 3 días a 3 semanas, pero esto no es limitante debido a que el tiempo de cultivo puede variar basándose en el volumen de células sembradas.

El sustrato cartilaginoso puede consistir en una o ambas de las sustancias normalmente producidas por condrocitos en el cuerpo y sustancias producidas en las condiciones de cultivo. Como tales sustancias pueden mencionarse glicosaminoglicanos (GAG) tales como condroitín sulfato, ácido hialurónico y keratán sulfato, o colágeno de tipo II. La cantidad de sustrato cartilaginoso puede medirse por cuantificación de GAG, por ejemplo.

Puesto que el injerto de regeneración tisular de la invención comprende por lo tanto numerosas células y abundante sustrato, este es altamente biocompatible y puede conseguir cuando se trasplanta eficazmente la reparación tisular.

Como ejemplos de afecciones para tratar, en las que puede usarse un complejo de un sustrato de regeneración tisular y condrocitos en el que se han cultivado condrocitos como un injerto, pueden mencionarse daño de cartílago, osteocondritis disecante, osteoartritis y artritis reumatoide, pero no se limitan a estas afecciones, y puede aplicarse a afecciones generales asociadas con pérdida de cartílago. Las células adecuadas para que se regenere el tejido pueden cultivarse en el sustrato de regeneración tisular para obtener un complejo para su uso en regeneración tisular.

Ejemplos

La presente invención se explicará en más detalle mediante ejemplos, con el entendimiento de la que invención no se limita en ningún modo por los ejemplos.

Ejemplo 1

En una solución de ácido poliláctico (nombre comercial: "Lacty9031" de Shimadzu Laboratories, peso molecular medio en peso: 168.000) en cloroformo (5 g/l) se mezcló fosfatidiletanolamina-dioleoiló (Wako Pure Chemical Industries, Co., Ltd.) como un tensioactivo en una proporción de 200:1, y la mezcla se vertió en un panel de vidrio y se permitió que se mantuviera a temperatura ambiente, 70% de humedad para el escape gradual del disolvente para preparar una película con una estructura en panal. Se muestra una microfotografía electrónica de la misma en la Fig. 3, que indica que se había obtenido una película en panal con un diámetro interno de cavidad medio de aproximadamente 5 μm .

Ejemplo 2

La película con una estructura en panal fabricada en el Ejemplo 1 se esterilizó con etanol al 70% y la película se insertó en un recipiente de cultivo celular esterilizado (diámetro: 15 mm). Se sembró una parte de 0,5 ml de fibroblastos fetales de ratón (células NIH3T3) (ATCC) a $3,6 \times 10^4$ células/ml en la película y se realizó su cultivo en medio de suero D-MEM en un incubador a 37 °C, CO₂ 5%. Después de 24 y 48 horas, la actividad metabólica de las células se midió por el procedimiento de Azul de Alamar, usando luz de excitación a una longitud de onda de 530 nm y detección de fluorescencia emergente a 590 nm. Los resultados se muestran en la Fig. 4 (En la Fig. 4, p representa el valor P (valor de probabilidad)).

Ejemplo Comparativo 1

En una solución de ácido poliláctico en cloroformo (5 g/l) se mezcló un polímero de poliacrilamida (peso molecular medio en peso: 85.000) preparado por el procedimiento descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada N° 2011-157574 como un tensioactivo en una proporción de 10:1, y la mezcla se vertió en un panel de vidrio y se permitió que se mantuviera a temperatura ambiente, 70% de humedad para el escape gradual del disolvente para preparar una película con una estructura en panal. Se muestra una microfotografía electrónica de la película obtenida en la Fig. 5, que indica que se había obtenido una película en panal con un diámetro interno de cavidad medio de aproximadamente 5 μm .

Ejemplo Comparativo 2

Se realizó un ensayo en el mismo procedimiento que el Ejemplo 2 usando la película fabricada en el Ejemplo Comparativo 1. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

Como se ve en la Fig. 4, el sustrato de regeneración tisular del Ejemplo 1 compuesto de ácido poliláctico y un fosfolípido mostró mayor actividad metabólica que el sustrato de regeneración tisular del Ejemplo Comparativo 1 compuesto de ácido poliláctico y un polímero anfipático.

Ejemplo 3

La película de estructura en panal fabricada en el Ejemplo 1 se esterilizó con etanol al 70% y se insertó en un recipiente de cultivo celular esterilizado. Por separado, se desprendió una tira de cartílago delgada por raspado de cartílago articular de rodilla de conejo con un bisturí y se cortó en trozo finos, después de lo cual se trató con enzima durante 1 hora en PBS(-) que contenía tripsina 0,15% (p/v), y después se incubó a 37 °C durante 2 horas y 30 minutos en PBS(-) que contenía colagenasa 0,15 (p/v). El filtrado obtenido por filtración usando un filtro de nailon con un tamaño de poro de 70 μm se centrifugó durante 3 minutos a 1500 rpm y se aclaró dos veces con medio de suero α -MEM que contenía un antibiótico y suero de ternero fetal 10%, después de lo cual se obtuvieron condrocitos de rodilla de conejo. Los condrocitos se cultivaron en medio de suero α -MEM en un incubador a 37 °C, CO₂ 5%. Los condrocitos del segundo subcultivo se separaron y se recogieron con tripsina 0,25%/1 mmol de EDTA/PBS(-), y se preparó una solución celular de 2×10^5 células/ml. Después de humectar la película de estructura en panal con 1 ml de medio, se sembró 1 ml de la solución celular en la misma. Después se alojó en una placa de 6 pocillos y se cultivó en un incubador de CO₂ 5%, a 37 °C. El medio completo se aspiró al día siguiente y se intercambió con 2 ml de medio que contenía ácido ascórbico 25 $\mu\text{g/ml}$ añadido al recipiente de cultivo celular, después de lo cual el medio se intercambió cada 2 días y se realizó cultivo permitiendo que la mezcla se mantuviera durante hasta 3 semanas. En los puntos de 3 y 10 días, se midió la actividad metabólica de las células mediante el procedimiento de Azul de Alamar. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Después de cultivar, el injerto se retiró del recipiente y se midió el contenido de GAG usando un kit Blyscan™ de Biocolor (Reino Unido). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Se muestra una microfotografía óptica del complejo obtenido de condrocitos y sustrato de regeneración de tejido cartilaginoso en la Fig. 6.

Ejemplo Comparativo 3

La película fabricada en el Ejemplo Comparativo 1 se usó para cultivar con el mismo procedimiento que el Ejemplo 3. En los puntos de 3 y 10 días, se midió la actividad metabólica de las células mediante el procedimiento de Azul de Alamar. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Intensidad de fluorescencia

	A los 3 días	A los 10 días
Ejemplo 3	40549	1763476
Ejemplo Comparativo 3	31221	1320767

El ensayo de actividad metabólica demostró que el sustrato de regeneración tisular hecho de una película compuesta de ácido poliláctico y un fosfolípido obtenido en el Ejemplo 1 muestra mayor actividad metabólica que el sustrato de regeneración tisular hecho de una película compuesta de ácido poliláctico y un polímero anfipático obtenido en el Ejemplo Comparativo 1.

Ejemplo Comparativo 4

Se cultivaron condrocitos (cultivo en monocapa) en el mismo procedimiento en una placa del mismo tamaño que el Ejemplo 3, y el contenido de GAG se midió después de 3 semanas de cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Ejemplo Comparativo 5

En el mismo procedimiento que el Ejemplo 3, se extrajeron condrocitos de conejo y se combinaron con medio de cultivo para preparar una suspensión de condrocitos, y la suspensión de condrocitos se incluyó en una cantidad igual de colágeno: atelocolágeno: Koken Co., Ltd.) a una densidad de 2×10^5 células/ml, tras lo cual se inició el cultivo. La concentración de colágeno final fue de 2,4% en peso. Éste se alojó después en una placa de 6 pocillos y se cultivó en un incubador de CO₂ 5%, 37 °C usando medio que contenía ácido ascórbico 25 µg/ml y el contenido de GAG se midió después de 3 semanas de cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Contenido de GAG de las células

	Contenido de GAG (µg/µg de ADN)
Ejemplo 3 (película de estructura en panal)	102
Ejemplo Comparativo 4 (cultivo en monocapa)	49
Ejemplo Comparativo 5 (gel de atelocolágeno)	39

Como se ha mostrado en la Tabla 2, la cantidad de síntesis de GAG en la película de estructura en panal fue más de dos veces la hallada con cultivo en monocapa, y casi 4 veces la hallada con cultivo en gel de atelocolágeno. Como se ha mencionado anteriormente, el contenido de GAG refleja la cantidad de sustrato cartilaginoso, y por lo tanto el Ejemplo 3 tuvo una mayor cantidad de producción de sustrato cartilaginoso.

Ejemplo Comparativo 6

Se preparó una película moldeada mezclando una solución de ácido poliláctico en cloroformo (5 g/l) con L-α-fosfatidiletanolamina-dioleoiló como un tensioactivo en una proporción de 200:1, vertiéndola en un panel de vidrio y permitiendo que se mantenga a temperatura ambiente para escape gradual del disolvente.

Ejemplo Comparativo 7

Se cultivaron condrocitos en las mismas condiciones que el Ejemplo 3 en una película moldeada obtenida para el Ejemplo Comparativo 6. La Fig. 7 muestra una microfotografía óptica del complejo de condrocitos y película moldeada obtenido.

Las Figs. 6 y 7 demuestran que con un sustrato de regeneración tisular hecho de una película con una estructura en panal de acuerdo con la invención, los condrocitos crecen de forma tridimensional sin alteración de la morfología celular, es decir, con una baja cantidad de cartílago fibroso, mientras que con el sustrato de regeneración tisular compuesto de una película moldeada simple, el resultado fue producción baja del sustrato extracelular y aplanamiento de las células, es decir, cartílago fibroso.

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* de una película con una estructura en panal que tiene un diámetro interno de cavidad medio de 0,1 a 20 μm , compuesta principalmente de un compuesto polimérico y un fosfolípido como un sustrato de regeneración tisular.
- 5 2. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho compuesto polimérico es un polímero biodegradable.
3. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho fosfolípido es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y sus derivados.
4. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho fosfolípido es fosfatidiletanolamina.
- 10 5. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho fosfolípido es L- α -fosfatidiletanolamina-dioleóilo.
6. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** la relación de composición del compuesto polimérico y el fosfolípido es de 10:1 a 500:1 en peso.
7. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el tejido es tejido cartilaginoso.
8. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células son mantenidas en dicho sustrato de regeneración tisular, formando de este modo un complejo de regeneración tisular.
- 15 9. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado porque** el tejido es tejido cartilaginoso.
10. El uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 8, en el que las células son mantenidas en el sustrato de regeneración tisular, cultivando células en el sustrato de regeneración tisular.
- 20 11. Una película con una estructura en panal que tiene un diámetro interno de cavidad medio de 0,1 a 20 μm , compuesta principalmente de un compuesto polimérico y un fosfolípido para su uso en un procedimiento de regeneración tisular.

Fig. 1

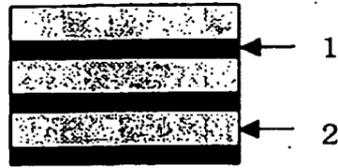


Fig. 2

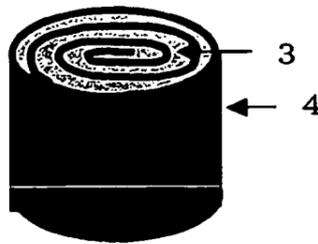


Fig. 3

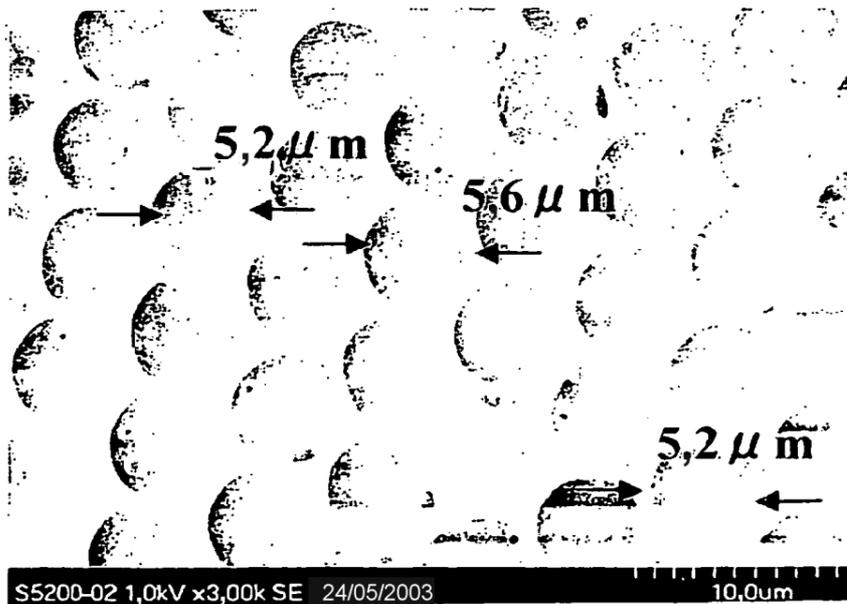


Fig. 4

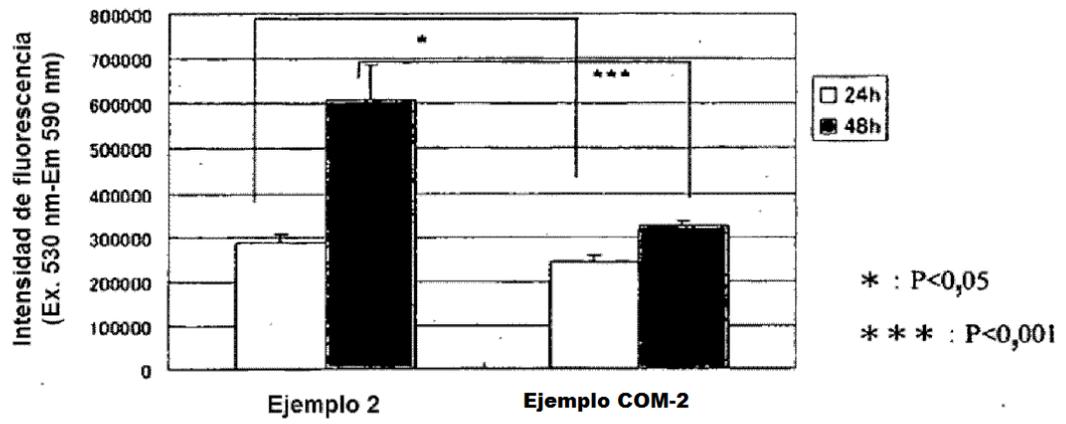


Fig. 5

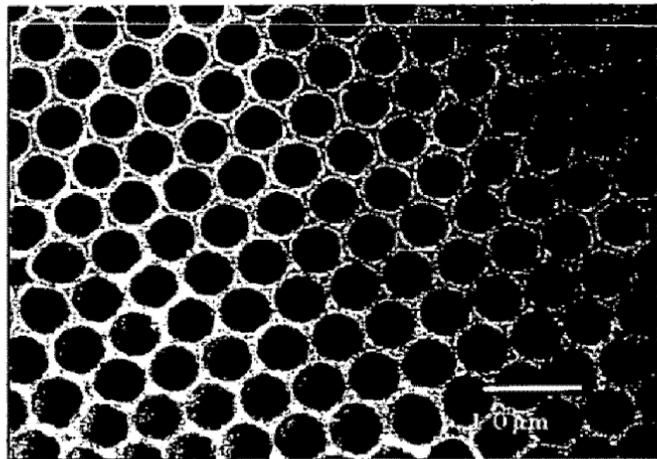


Fig. 6



Fig. 7

