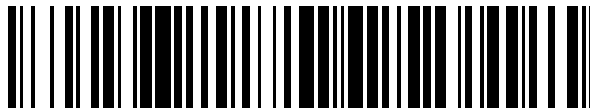


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 774**

51 Int. Cl.:

A61L 27/20 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2008 E 08837699 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 2200671**

54 Título: **Métodos para preparar andamio poroso para la ingeniería de tejidos**

30 Prioridad:

11.10.2007 EP 07301451

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.06.2013

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) (50.0%)
101 RUE DE TOLBIAC
75654 PARIS CEDEX 13, FR y
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LE VISAGE, CATHERINE;
LETOURNEUR, DIDIER;
CHAUBET, FRÉDÉRIC y
AUTISSIER, AUDE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 405 774 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

Métodos para preparar andamio poroso para la ingeniería de tejidos.

Campo de la invención.

5 La presente invención se refiere a un método para preparar un andamio ("scaffold") poroso para la ingeniería de tejidos. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un andamio poroso que puede obtenerse mediante el método descrito anteriormente, y su uso para la ingeniería de tejidos, el cultivo celular y el transporte celular.

Antecedentes de la invención.

10 La ingeniería de tejidos en general se define como la creación de equivalentes de tejidos u órganos sembrando células sobre o en el interior de un andamio adecuado para la implantación. Los andamios deben ser biocompatibles, y las células deben poder fijarse y proliferar sobre los andamios para que formen equivalentes de tejidos u órganos. Por tanto, puede considerarse que estos andamios son sustratos para el crecimiento celular *in vitro* o *in vivo*.

15 Los atributos de un andamio biocompatible ideal incluirían la capacidad para mantener el crecimiento celular *in vitro* o *in vivo*, la capacidad de mantener el crecimiento de una amplia variedad de tipos o linajes celulares, la capacidad de estar dotado de diferentes grados de flexibilidad o de rigidez necesarios, la capacidad de tener diversos grados de biodegradabilidad, la capacidad de ser introducido en el sitio previsto *in vivo* sin provocar daños secundarios, y la capacidad para actuar como vehículo o depósito para el transporte de fármacos, células y/o sustancias bioactivas hasta el sitio de acción deseado.

20 Se ha utilizado una serie de diferentes materiales de andamio para la regeneración de tejidos guiada y/o como superficies biocompatibles. En muchos casos se prefieren materiales poliméricos biodegradables, puesto que el andamio se degrada a lo largo del tiempo y, finalmente, la estructura de células-andamio es sustituida por completo por células. Entre los muchos candidatos que pueden actuar como andamios útiles que pueden mantener el crecimiento o la regeneración de tejidos se incluyen geles, espumas, láminas, y numerosas estructuras en partículas porosas de distantes formas y configuraciones.

25 Entre los diversos polímeros naturales que se han descrito como útiles para el cultivo o la ingeniería de tejidos, se pueden enumerar diversos constituyentes de la matriz extracelular, incluyendo fibronectina, diversos tipos de colágeno, y laminina, así como queratina, fibrina y fibrinógeno, ácido hialurónico, sulfato de heparina, sulfato de condroitina y otros.

30 Otros polímeros habituales que se han utilizado incluyen la poli(lactida-co-glicólido) (PLG). Las PLG son polímeros hidrolíticamente degradables que están aprobados por la FDA para su uso en el cuerpo humano y son fuertes desde el punto de vista mecánico (Thomson, R.C., Yaszemski, M.J., Powers, J.M., Mikos, A.G., Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone, J. Biomater. Sci. Polym. Ed., 1995, 7(1):23-38; Wong, W.H., Mooney, D.J., Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering, en: Atala, A., Mooney, D.J., editores, Langer, R., Vacanti, J.P., editores asociados, Synthetic biodegradable polymer scaffolds, Boston, Birkhäuser, 1997, pp. 51-82). Sin embargo son hidrófobos y generalmente se procesan bajo condiciones relativamente rigurosas, que hace que el factor de incorporación y atrapamiento de las células viables sea potencialmente un reto.

35 Como alternativa, se ha empleado una diversidad de hidrogeles, una clase de materiales poliméricos muy hidratados (con un contenido en agua mayor que 30% en peso), como materiales de andamio. Están compuestos de cadenas poliméricas hidrófilas, que son de origen natural o sintético. La integridad estructural de los hidrogeles depende de la reticulación formada entre las cadenas poliméricas a través de diversos enlaces químicos e interacciones físicas. Los hidrogeles utilizados en estas aplicaciones son generalmente degradables, pueden procesarse bajo condiciones relativamente suaves, tienen propiedades mecánicas y estructurales similares a muchos tejidos y a la matriz extracelular, y pueden introducirse de una manera mínimamente invasiva (Lee, K.Y., Mooney, D.J., Hydrogels for tissue engineering, Chem. Rev., julio de 2001, 101(7):1869-1879). Por tanto, se han utilizado diversos polímeros para procesar hidrogeles. Por ejemplo, estos polímeros incluyen colágeno, gelatina, ácido hialurónico (HA), y quitosano.

40 El uso de polisacáridos naturales también representa una alternativa prometedora para fabricar andamios basados en hidrogeles, porque no son antigénicos ni inmunogénicos, y algunos presentan efectos antitrombóticos e interacciones con factores del crecimiento vascular. Además, debido a sus propiedades de plasticidad, los hidrogeles basados en polisacáridos pueden conformarse en diversas formas para permitir el diseño de materiales de injerto o implante terapéuticos.

45 Por ejemplo, Chaouat *et al.* (Chaouat, M., Le Visage, C., Autissier, A., Chaubet, F., Letourneur, D., The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats, Biomaterials, noviembre de 2006, 27(32):5546-5553, Epub, 20 de julio de 2006) han diseñado un nuevo andamio basado en polisacáridos preparado utilizando una mezcla de pululano y dextrano. La reticulación química de los polisacáridos se realizó utilizando el agente reticulante

trimetafosfato de trisodio (STMP). Después, se demostró *in vivo* la eficacia de un material arterial preparado con este andamio.

5 Sin embargo, a pesar de la ventaja de utilizar polisacáridos para preparar andamios según se describen en Chaouat *et al.* (2006), la falta de porosidad del andamio resultante sigue siendo un inconveniente para considerar un uso eficaz para fines terapéuticos. En realidad, la porosidad es una característica fundamental para permitir la proliferación, la integración y la diferenciación de las células dentro del andamio, de modo que el material puede utilizarse como depósito de células para reconstruir *in vivo* el tejido u órgano.

10 El documento US 2004/0063206 describe un método para fabricar andamios programables para el cultivo de células con combinaciones de moléculas que estimulan la fijación celular o que tienen funciones de señalización celular. El andamio tridimensional se obtiene con estructuras de poros interconectados; estas estructuras porosas surgen a partir de cristales de hielo formados durante la congelación, y cuando los cristales se liofilizan, el espacio que dejan los cristales de hielo forman estructuras de poros interconectados.

15 El documento US 2002/0187182 describe materiales poliméricos reticulables, que normalmente se utilizan para formar geles, que pueden emplearse para formar materiales macroporosos que tienen propiedades de gel y macroporosidad. Los geles se forman disolviendo un polímero reticulable en agua (sin reticularlo); congelando la disolución acuosa; liofilizando la disolución para formar una lana porosa seca; y reticulando los polímeros en el estado de lana. La lana es útil como dispositivo de transporte de fármacos, y para regenerar y reconstruir tejidos, tales como cartílago, tendón, menisco y ligamentos.

20 El documento WO 2007/056418 describe andamios con una forma muy porosa, obtenidos liofilizando y sublimando el material.

Por tanto, en la técnica es necesario desarrollar un método para preparar matrices de andamios porosos que puedan utilizarse para fines terapéuticos.

Sumario de la invención.

25 Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar un andamio poroso, que comprende las etapas que consisten en:

a) preparar una disolución acuosa alcalina que comprende una cantidad de al menos un polisacárido y un agente reticulante;

b) congelar la disolución acuosa de la etapa a);

c) sublimar la disolución congelada de la etapa b);

30 que se caracteriza porque la etapa b) se realiza antes de que se produzca la reticulación del polisacárido en la disolución de la etapa a).

Según la invención, la expresión "la etapa b) se realiza antes de que se produzca la reticulación del polisacárido en la disolución de la etapa a)" significa que la reticulación del polisacárido se produce durante la etapa de sublimación (etapa c)).

35 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un andamio poroso obtenible mediante el método descrito anteriormente.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el uso de un andamio poroso de la invención para la ingeniería de tejidos.

Descripción detallada de la invención.

40 Definiciones.

El término "polisacárido", tal como se emplea en la presente, se refiere a una molécula que comprende dos o más unidades de monosacárido.

La expresión "disolución alcalina", tal como se emplea en la presente, se refiere a una disolución que tiene un pH mayor que 7.

45 La expresión "disolución acuosa", tal como se emplea en la presente, se refiere a una disolución en la que el disolvente es agua.

El término "reticular" se refiere a la conexión de una cadena polimérica con otra mediante enlaces covalentes.

Tal como se emplea en la presente, un "andamio" se define como un sistema semisólido que comprende una red

tridimensional de una o más especies de cadenas de polisacáridos. Dependiendo de las propiedades del polisacárido (o polisacáridos) utilizado, así como de la naturaleza y la densidad de la red, estas estructuras en equilibrio pueden contener diversas cantidades de agua.

5 La expresión “agente reticulante” incluye cualquier agente capaz de introducir reticulaciones entre las cadenas de los polisacáridos de la invención.

El término “biodegradable”, tal como se emplea en la presente, se refiere a materiales que se degradan *in vivo* para producir compuestos no tóxicos, que pueden ser excretados o posteriormente metabolizados.

10 El término “sublimación” se refiere a la transición de fase física desde un estado sólido directamente a un estado de vapor. De modo más específico, la sublimación es un proceso en el que una sustancia pasa de sólido a gas sin pasar por una fase líquida. La sublimación de una disolución puede obtenerse mediante el proceso de liofilización.

El término “liofilización” es el término para el secado de un material totalmente congelado a un vacío elevado mediante la separación del disolvente congelado (es decir, agua) y después la evaporación de este en estado congelado.

Andamios porosos y un método para su preparación.

15 Un primer objeto de la invención se refiere a un método para preparar un andamio poroso, que comprende las etapas que consisten en:

a) preparar una disolución acuosa alcalina que comprende una cantidad de al menos un polisacárido y un agente reticulante;

b) congelar la disolución acuosa de la etapa a);

20 c) sublimar la disolución congelada de la etapa b);

que se caracteriza porque la etapa b) se realiza antes de que se produzca la reticulación del polisacárido en la disolución de la etapa a).

25 Según la invención, la expresión “la etapa b) se realiza antes de que se produzca la reticulación del polisacárido en la disolución de la etapa a)” significa que la reticulación del polisacárido se produce durante la etapa de sublimación (etapa c)).

30 En la presente invención puede utilizarse cualquier tipo de polisacárido. Pueden utilizarse polisacáridos sintéticos o naturales para los fines de la invención. Por ejemplo, los polisacáridos naturales adecuados incluyen, pero no se limitan a dextrano, agar, ácido alginico, ácido hialurónico, inulina, pululano, heparina, fucoidano, quitosano, escleroglucano, curdlano, almidón, celulosa y sus mezclas. Pueden incluirse polisacáridos químicamente modificados que portan, por ejemplo, grupos ácidos (carboxilato, sulfato, fosfato), grupos amino (etilenamina, dietilaminoetilamina, propilamina), y grupos hidrófobos (alquilo, bencilo). Los monosacáridos que pueden utilizarse para producir el polisacárido deseado incluyen, pero no se limitan a ribosa, glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sorbosa, sorbitol, manitol, iditol, dulcitol y sus mezclas. Muchos de estos compuestos están disponibles en el mercado en empresas tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, Michigan, EEUU).

35 El peso molecular medio ponderado preferido para el polisacárido es de aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente 2.000.000 Daltons, más preferiblemente de aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente 500.000 Daltons, lo más preferiblemente de aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente 200.000 Daltons.

40 En una realización de la invención, el polisacárido (o polisacáridos) utilizado para preparar el andamio de la invención es un polisacárido neutro, tal como dextrano, agar, pululano, inulina, escleroglucano, curdlano, almidón, celulosa o sus mezclas. En una realización preferida, se emplea una mezcla de pululano y dextrano para preparar el andamio de la invención. Por ejemplo, dicha mezcla comprende 25% de dextrano y 75% de pululano.

En otra realización de la invención, el polisacárido (o polisacáridos) utilizado para preparar el andamio de la invención es un polisacárido cargado positivamente, tal como quitosano, DEAE-dextrano y sus mezclas.

45 En otra realización de la invención, el polisacárido (o polisacáridos) utilizado para preparar el andamio de la invención es un polisacárido cargado negativamente, tal como ácido alginico, ácido hialurónico, heparina, fucoidano y sus mezclas.

En otra realización de la invención, el polisacárido (o polisacáridos) utilizado para preparar el andamio de la invención es una mezcla de polisacáridos neutros y cargados negativamente, en el que los polisacáridos cargados negativamente representan del 1% al 20%, preferiblemente del 5% al 10% de la mezcla.

50 En una realización concreta, el agente reticulante se selecciona del grupo que consiste en trimetafosfato de trisodio (STMP), oxiclورو de fósforo (POCl₃), epíclorohidrina, formaldehídos, carbodiimidas hidrosolubles, glutaraldehídos o

5 cualquier otro compuesto que sea adecuado para reticular un polisacárido. En una realización preferida, el agente reticulante es STMP. La concentración del agente reticulante en la disolución acuosa (en p/v) es de aproximadamente 1% a aproximadamente 6%, más preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 6%, lo más preferiblemente de aproximadamente 2% a aproximadamente 3%. Se prefiere utilizar el agente reticulante a una cantidad de modo que la proporción en peso del polisacárido al agente reticulante esté en el intervalo de 20:1 a 1:1, preferiblemente de 15:1 a 1:1, y lo más preferiblemente de 10:1 a 1:1. Muchos de estos compuestos están disponibles en el mercado en empresas tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, Michigan, EEUU).

10 La disolución acuosa que comprende el polisacárido puede comprender además diversos aditivos dependiendo de la aplicación prevista. Preferiblemente, el aditivo es compatible con el polisacárido y no interfiere con la reticulación eficaz del polisacárido (o los polisacáridos). La cantidad de aditivo utilizada depende de la aplicación concreta, y los expertos en la técnica pueden determinarla con facilidad utilizando la experimentación habitual.

15 La disolución acuosa que comprende el polisacárido puede incluir opcionalmente al menos un agente antimicrobiano. Los conservantes antimicrobianos adecuados son muy conocidos en la técnica. Los ejemplos de antimicrobianos adecuados incluyen, pero no se limita a alquilparabenos, tales como metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno, cresol, clorocresol, hidroquinona, benzoato de sodio, benzoato de potasio, triclosano y clorhexidina. Otros ejemplos de agentes antibacterianos y de agentes antiinfecciosos que pueden utilizarse son, sin limitarse a rifampicina, minociclina, clorhexidina, agentes de iones de plata y composiciones con una base de plata.

20 La disolución acuosa que comprende el polisacárido también puede incluir opcionalmente al menos un colorante para potenciar la visibilidad de la disolución. Los colorantes adecuados incluyen tintes, pigmentos, y agentes colorantes naturales. Los ejemplos de colorantes adecuados incluyen, pero no se limita a azul alciano, isotiocianato de fluoresceína (FITC), y FITC-dextrano.

25 La disolución acuosa que comprende el polisacárido también puede incluir opcionalmente al menos un tensioactivo. El tensioactivo, tal como se emplea en la presente, se refiere a un compuesto que disminuye la tensión superficial del agua. El tensioactivo puede ser un tensioactivo iónico, tal como laurilsulfato de sodio, o un tensioactivo neutro, tal como polioxietilén éteres, polioxietilén ésteres, y polioxietilensorbitano.

30 Una característica fundamental de la invención es que la etapa b) se realiza antes de que se produzca la reticulación del polisacárido en la disolución de la etapa a) (véase el ejemplo 1). La temperatura y el tiempo son los principales factores que controlan la reticulación de la disolución acuosa. Para evitar o limitar gravemente la reticulación del polisacárido, la disolución acuosa puede prepararse a una temperatura menor que 37 °C, más preferiblemente entre 4 °C y 25 °C. Además, la etapa b) puede realizarse lo más rápidamente posible para evitar la reticulación de dicho polisacárido.

35 Cuando se ha preparado la disolución acuosa, esta se congela. La congelación de la disolución acuosa puede realizarse a diferentes velocidades (por ejemplo, °C/min). Por ejemplo, la congelación puede realizarse a una velocidad de aproximadamente 1 °C/min a aproximadamente 200 °C/min, preferiblemente de aproximadamente 1 °C/min a aproximadamente 20 °C/min, y lo más preferiblemente de aproximadamente 5 °C/min a aproximadamente 10 °C/min. La disolución puede congelarse en nitrógeno líquido o en hielo seco.

40 Cuando la disolución acuosa está congelada puede realizarse la sublimación. En una realización preferida, el método para preparar andamios porosos según la presente invención incluye un proceso de liofilización.

45 Por tanto, según la invención, el proceso de liofilización debe realizarse antes de que se produzca el proceso de reticulación en la disolución acuosa.

La liofilización puede realizarse con cualquier aparato conocido en la técnica. Existen fundamentalmente tres categorías de liofilizadores: los evaporadores rotatorios, los secadores por congelación de colectores, y los secadores por congelación de bandeja. Estos aparatos son muy conocidos en la técnica y pueden adquirirse en el mercado, tal como el liofilizador Lyovac (GT2, bomba de aspas rotatorias STERIS, BOC EDWARDS).

50 Básicamente, la disolución acuosa totalmente congelada se coloca en una cámara. Después la temperatura de la cámara aumenta hasta un nivel mayor que el punto de ebullición del vapor licuado, por lo cual el vapor se volatiliza y se elimina. Por ejemplo, la temperatura de la cámara puede ser de -70 °C a -1 °C, preferiblemente de -70 °C a -40 °C, más preferiblemente de aproximadamente -50 °C a -40 °C. El calentamiento de la cámara se produce al mismo tiempo que un flujo de vacío para disminuir la presión de la cámara. Generalmente, el vacío de la cámara es de 10 Pa (0,1 mBar) a aproximadamente 650 Pa (6,5 mBar).

La liofilización se realiza durante un tiempo suficiente para eliminar al menos 98,5% de agua, preferiblemente al menos 99% de agua, más preferiblemente al menos 99,5%.

55 La congelación de la disolución acuosa provoca la formación de partículas de hielo del agua. Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, bajo las condiciones de temperatura y presión descritas anteriormente, el agua incluida en la disolución acuosa se sublima y, así, deja intersticios en el material en los espacios previamente

ocupados por las partículas de hielo, y por consiguiente se producen andamos porosos conformados. De modo sorprendente, el proceso de reticulación se produce durante el proceso de liofilización.

5 Por tanto, puede variarse la densidad del material y el tamaño de poro del andamio resultante controlando la velocidad de liofilización de la disolución acuosa congelada. El parámetro fundamental en un proceso de liofilización es la velocidad de vacío. En los ejemplos, los inventores en efecto han demostrado que diferentes velocidades de vacío conducen a diferentes tamaños y densidades de los poros en el andamio.

10 El tamaño medio de poro del andamio es de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 500 μm , preferiblemente de aproximadamente 150 μm a aproximadamente 350 μm , más preferiblemente de aproximadamente 175 μm a aproximadamente 300 μm . La densidad de los poros es de aproximadamente 4% al 75%, preferiblemente de aproximadamente 4% a aproximadamente 50%.

15 En otra realización, el método de la invención comprende otra etapa que consiste en hidratar el andamio preparado según la invención. Dicha hidratación puede realizarse sumergiendo el andamio en una disolución acuosa (por ejemplo, agua desionizada, agua filtrada mediante ósmosis inversa, una disolución salina, o una disolución acuosa que contiene un ingrediente activo adecuado) durante un tiempo suficiente para producir un andamio que tiene el contenido en agua deseado. Por ejemplo, cuando se desea un andamio que comprenda el máximo contenido en agua, el andamio se sumerge en la disolución acuosa durante un tiempo suficiente para permitir que el andamio se hinche hasta su tamaño o volumen máximo. Generalmente, el andamio se sumerge en la disolución acuosa durante al menos aproximadamente 1 hora, preferiblemente durante al menos aproximadamente 2 horas, y más preferiblemente durante aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas. Se entiende que la cantidad de tiempo necesaria para hidratar el andamio hasta el nivel deseado dependerá de varios factores, tales como la composición de los polisacáridos utilizados, el tamaño (por ejemplo, espesor) del andamio, y la temperatura y la viscosidad de la disolución acuosa, así como otros factores.

20 En una realización concreta, el andamio hidratado comprende 80% de agua, preferiblemente 90% de agua, y lo más preferiblemente 95% de agua.

25 En otra realización concreta, la disolución de polisacáridos acuosa puede verterse en un molde antes de la congelación y la sublimación, de modo que el molde poroso obtenido con el método de la invención puede tomar una forma deseada. Puede utilizarse cualquier molde geométrico según la invención. También se contemplan diferentes tamaños. Por ejemplo, generalmente, la disolución acuosa puede verterse en un molde tubular con un eje central, de modo que el andamio poroso puede ser tubular con un diámetro externo e interno deseados (véase el ejemplo 6). El molde puede estar fabricado con cualquier material, pero los materiales preferidos incluyen superficies no pegajosas, tales como teflón.

30 Como alternativa, los andamios de la invención pueden cortarse y conformarse para obtener un tamaño y una forma adecuados.

35 El método de la invención puede incluir también la etapa de esterilizar el andamio utilizando cualquier proceso adecuado. El andamio puede esterilizarse en cualquier momento, pero preferiblemente se esteriliza después de que el andamio se hidrate. Las técnicas de esterilización no irradiantes adecuadas incluyen, pero no se limita a métodos de exposición a UV, de plasma gaseoso, o de óxido de etileno conocidos en la técnica. Por ejemplo, el andamio puede esterilizarse utilizando un sistema de esterilización que está disponible en Abtox, Inc. of Mundelein, Illinois, con la marca comercial PlazLyte, o según los procesos de esterilización de plasma gaseoso descritos en los documentos US 5413760 y US 5603895.

40 El andamio producido mediante los métodos de la invención puede envasarse en cualquier material de envasado adecuado. De modo deseable, el material de envasado mantiene la esterilidad del andamio hasta que se abre el material de envasado.

45 En otra realización, pueden incorporarse una o más biomoléculas al andamio poroso. Las biomoléculas pueden comprender, en otras realizaciones, fármacos, hormonas, antibióticos, sustancias antimicrobianas, tintes, sustancias radiactivas, sustancias fluorescentes, sustancias antibacterianas, agentes o productos químicos, incluyendo cualquiera de sus combinaciones. Las sustancias pueden utilizarse para potenciar los efectos de un tratamiento, potenciar la visualización, indicar la orientación correcta, resistir una infección, estimular la curación, aumentar la blandura o cualquier otro efecto deseable. En dicha realización, el andamio de la invención, que comprende una o más biomoléculas tal como se describió anteriormente, puede utilizarse como un sistema de liberación controlada de un agente activo.

50 En una realización, la biomolécula puede comprender agentes quimiotácticos, antibióticos, analgésicos esteroideos o no esteroideos, antiinflamatorios, inmunosupresores, fármacos anticáncer, diversas proteínas (por ejemplo, péptidos de cadena corta, proteína morfogénicas óseas, glicoproteínas y lipoproteínas); mediadores de la fijación de células; ligandos biológicamente activos; secuencias de unión de integrina; ligandos; diversos agentes del crecimiento y/o de la diferenciación (por ejemplo, factor del crecimiento epidérmico, IGF-I, IGF-II, TGF-beta, factores del crecimiento y de la diferenciación, factor derivado estromático SDF-1; factores del crecimiento endotelial

vascular, factores del crecimiento de fibroblastos, factores del crecimiento derivados de plaquetas, factor del crecimiento derivado de insulina y factores del crecimiento transformante, hormona paratiroidea, péptido relacionado con la hormona paratiroidea, bFGF; factores de la superfamilia del TGF-beta; BMP-2; BMP-4; BMP-6; BMP-12; erizo sónico; GDF5; GDF6; GDF8; PDGF); moléculas pequeñas que afectan a la sobreexpresión de factores del crecimiento específicos; tenascina-C; ácido hialurónico; sulfato de condroitina; fibronectina; decorina; tromboelastina; péptidos derivados de trombina; dominios de unión a la heparina; heparina; sulfato de heparano; fragmentos de ADN, plásmidos de ADN, Si-ARN, agentes de transfección o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización, los factores del crecimiento incluyen el factor del crecimiento de unión a la heparina (HBGF), factor del crecimiento transformante alfa o beta (TGF), factor del crecimiento fibroblástico alfa (FGF), factor del crecimiento epidérmico (TGF), factor del crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y SDF-1, algunos de los cuales también son factores angiogénicos. En otra realización, los factores incluyen hormonas, tales como insulina, glucagón, y estrógeno. En algunas realizaciones, puede resultar deseable incorporar factores tales como el factor del crecimiento nervioso (NGF) o el factor morfogénico muscular (MMF). En una realización, se incorpora TNF alfa/beta, o metaloproteinasas de matriz (MMP).

Además, los andamios de la invención pueden incluir opcionalmente agentes antiinflamatorios, tales como indometacina, acetato del ácido salicílico, ibuprofeno, sulindaco, piroxicamo, y naproxeno; agentes trombogénicos, tales como trombina, fibrinógeno, homocisteína, y estramustina; y compuestos radioopacos, tales como sulfato de bario, partículas de oro y nanopartículas de óxido de hierro (USPIO).

Además, los andamios de la invención pueden comprender opcionalmente agentes antitrombóticos, tales como antivitamina K o aspirina, agentes antiplaquetas, tales como aspirina, tienopiridina, dipiridamol o clopidogrel (que inhiben de forma selectiva e irreversible la agregación de plaquetas inducida por adenosina difosfato (ADP)), o un agente anticoagulante, tal como heparina. La combinación de heparina (anticoagulante) y tirofiban (agente antiplaquetas) ha demostrado ser eficaz para reducir los trombos y el tromboembolismo, y puede incorporarse. También puede incorporarse genisteína, una isoflavona potencial que posee propiedades antiproliferativas y antiplaquetas dependientes de la dosis e inhibe la agregación plaquetaria inducida por colágeno responsable de la trombosis primaria.

Métodos para utilizar los andamios de la invención.

Los andamios de la invención resultan especialmente adecuados para la ingeniería, la reparación o la regeneración de tejidos. Una diferencia en la porosidad puede facilitar la migración de diferentes tipos celulares hacia las regiones apropiadas del andamio. En otra realización, una diferencia en la porosidad puede facilitar el desarrollo de conexiones apropiadas de célula a célula entre los tipos celulares que forman el andamio, requeridas para la estructuración apropiada del tejido en desarrollo/reparación/regeneración. Por ejemplo, la extensión de procesos celulares puede alojarse de modo más apropiado por la variada porosidad del material del andamio. Por tanto, el andamio puede comprender células de cualquier tejido.

En una realización concreta, las células se siembran sobre dicho andamio. En otra realización, los andamios de la invención se sumergen en una disolución de cultivo que comprende las células deseadas durante un tiempo suficiente para permitir la penetración de las células a través del andamio.

En otra realización, el andamio de la invención es capaz de mantener la viabilidad y el crecimiento de las células sembradas en cultivo durante largos periodos de tiempo sin inducir la diferenciación.

En otra realización, el andamio de la invención proporciona un entorno para el crecimiento celular no estimulado (sin la activación por estimulantes del crecimiento).

En otra realización, el andamio de la invención puede utilizarse para estudiar procesos fisiológicos y patológicos, tales como el crecimiento de tejidos, la remodelación ósea, la curación de heridas, la tumorigénesis (incluyendo la migración y la invasión), y la angiogénesis. El andamio permite la creación de entornos definidos y controlados en los que puedan modularse procesos específicos y estudiarse de una manera controlada sin factores endógenos.

En particular, el andamio de la invención puede utilizarse para el cultivo tridimensional para dosificaciones de diagnóstico o toxicológicas. En esta realización, el andamio de la invención permite la evaluación de la toxicidad de un producto directamente sobre las células presentes en un entorno tridimensional. En dicha realización, el andamio de la invención se emplea para cultivar células útiles para la evaluación de la toxicidad y/o la farmacología de un producto, tales como hepatocitos, células precursoras embrionarias, células epiteliales, queratinocitos, o células precursoras pluripotenciales inducidas (células iPS).

En otra realización, el andamio de la invención puede mantener el crecimiento y la diferenciación de tipos celulares *in vitro* e *in vivo*.

En otra realización, las células son células precursoras o progenitoras. En otra realización, las células pueden incluir, pero no se limitan a condrocitos; fibrocondrocitos; osteocitos; osteoblastos; osteoclastos; sinoviocitos; células de la médula ósea; células mesenquimáticas; células epiteliales; hepatocitos; células musculares; células estromáticas;

5 células precursoras; células precursoras embrionarias; células precursoras derivadas de tejido adiposo; células progenitoras de sangre periférica; células precursoras aisladas de tejido adulto; células precursoras pluripotenciales inducidas (células iPS); células genéticamente transformadas; una combinación de condrocitos y otras células; una combinación de osteocitos y otras células; una combinación de sinoviocitos y otras células; una combinación de células de médula ósea y otras células; una combinación de células mesenquimáticas y otras células; una combinación de células estromáticas y otras células; una combinación de células precursoras y otras células; una combinación de células precursoras embrionarias y otras células; una combinación de células progenitoras aisladas de tejido adulto y otras células; una combinación de células precursoras de sangre periférica y otras células; una combinación de células precursoras aisladas de tejido adulto y otras células; y una combinación de células genéticamente transformadas y otras células.

10 En otra realización, cualquiera de estas células para su uso en los andamios y los métodos de la invención puede modificarse genéticamente para que exprese una molécula deseada tal como, por ejemplo, el factor del crecimiento de unión a heparina (HBGF), el factor del crecimiento transformante alfa o beta (TGF-beta), el factor del crecimiento fibroblástico alfa (FGF), el factor del crecimiento epidérmico (TGF), el factor del crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y SDF-1, algunos de los cuales también son factores angiogénicos. En otra realización, los factores expresados incluyen hormonas, tales como insulina, glucagón, y estrógeno. En algunas realizaciones, se expresan factores tales como el factor del crecimiento nervioso (NGF) o el factor morfogénico muscular (MMF), o en otra realización, se expresa TNF alfa/beta.

15 En una realización concreta, los andamios de la invención son adecuados para preparar sustitutos vasculares para reemplazar arterias comprometidas según se describe, por ejemplo, en Chaouat *et al.* (Chaouat, M., Le Visage, C., Autissier, A., Chaubet, F., Letourneur, D., The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats, *Biomaterials*, noviembre de 2006, 27(32):5546-53, Epub, 20 de julio de 2006). Estos sustitutos pueden prepararse según los métodos de la invención empleando un molde según se ha descrito anteriormente. Estos sustitutos entonces pueden comprender una población de células para reconstruir un vaso *in vitro* o *in vivo*. En otra realización, las células pueden incluir, pero no se limitan a células precursoras mesenquimáticas (MSC), células progenitoras endoteliales (EPC), células endoteliales, células fibroblásticas y células del músculo liso.

20 En otra realización concreta, los andamios de la invención son adecuados para preparar implantes de cartílago o hueso. De esta forma, los andamios de invención pueden cargarse con condrocitos, osteocitos; osteoblastos; osteoclastos; células vasculares o sus mezclas, y pueden cultivarse en presencia de agentes de la diferenciación.

25 El sitio de la implantación depende del tejido enfermo/lesionado que requiere tratamiento. Por ejemplo, para tratar defectos estructurales en el cartílago articular, el menisco y el hueso, el andamio de material compuesto sembrado con células se colocará en el sitio del defecto para estimular la reparación del tejido dañado.

30 En el caso de lesiones del sistema nervioso central (CNS), el andamio de material compuesto puede sembrarse con una combinación de células precursoras neuronales adultas, células precursoras embrionarias, células de la glía y células de Sertoli. En la realización preferida, el andamio de material compuesto puede sembrarse con células de Sertoli derivadas de líneas de células transformadas, fuentes xenogéneas o alogéneas, en combinación con células precursoras neuronales. Las células de Sertoli pueden cultivarse con el andamio de material compuesto durante un periodo de tiempo antes de la adición de las células precursoras y la posterior implantación en el sitio de la lesión. Esta estrategia puede evitar uno de los principales obstáculos de la terapia celular para aplicaciones en el CNS, concretamente la supervivencia de las células precursoras después del trasplante. Un andamio de material compuesto que atrape a un número grande de células de Sertoli puede proporcionar un entorno que sea más propicio a la supervivencia de las células precursoras.

35 Por consiguiente, el andamio de polímero poroso, que se prepara según la presente invención, puede utilizarse de modo eficaz como materia prima para fabricar tejidos u órganos artificiales, tales como vasos sanguíneos artificiales, esófagos artificiales, una vejiga artificial, nervios artificiales, corazones artificiales, válvulas cardíacas prostáticas, pieles artificiales, implantes ortopédicos, músculos artificiales, ligamentos artificiales, órganos respiratorios artificiales, etc. Además, el andamio de polímero poroso de la presente invención puede prepararse en forma de un tejido híbrido mezclándolo o incorporándolo sobre o dentro de otros tipos de biomateriales y con células funcionales derivadas de tejidos u órganos. Puede tener diversas aplicaciones biomédicas, por ejemplo, para mantener funciones celulares, regeneración de tejidos, etc.

40 Como alternativa, los andamios de la invención pueden utilizarse para el transporte de células para un uso terapéutico. De hecho, los andamios de la invención pueden utilizarse como materia prima para preparar sistemas de transporte de células que puedan ser administrados a un sujeto para fines terapéuticos o de diagnóstico. En una realización concreta, los andamios de la invención pueden utilizarse para preparar un parche, una biopelícula o un vendaje que puede cargarse con células, preferentemente con células autólogas. Pueden obtenerse células humanas y animales después de un cultivo celular y directamente de cepas congeladas de células. Por ejemplo, los andamios de la invención pueden utilizarse para preparar un vendaje que contenga células que puede aplicarse sobre la piel, para reconstruir o curar la piel. Como alternativa, dicho vendaje puede utilizarse para ser aplicado al corazón de un sujeto para tratar la isquemia (infarto de miocardio). En estas realizaciones, las células que están atrapadas en el andamio pueden así migrar hacia el tejido u órgano diana.

5 En otra realización, los andamios de la invención pueden utilizarse para cultivar células. Las células después pueden estimularse para que crezcan o se diferencien o para que sufran otros procesos fisiológicos mediante la adición de los factores del crecimiento apropiados. Puede utilizarse un medio de cultivo que contenga una o más citoquinas, factores del crecimiento, hormonas o sus combinaciones, para mantener a las células en un estado indiferenciado, o para diferenciar a las células para que sigan una vía concreta.

Más en concreto, el andamio de la invención puede utilizarse para producir moléculas de interés. De hecho, los andamios de la invención pueden utilizarse para proporcionar un entorno biológico para el anclaje de células en un biorreactor, de modo que las células pueden producir las moléculas deseadas. Los andamios de la invención proporcionan protección mecánica y bioquímica a las células cultivadas.

10 Los andamios pueden así actuar como un depósito celular para producir moléculas deseadas, tales como proteínas, moléculas orgánicas, y nucleótidos. Por ejemplo, las proteínas de interés incluyen, pero no se limitan a factores del crecimiento, hormonas, moléculas señal, inhibidores del crecimiento celular, y anticuerpos. Los andamios de la invención son particularmente interesantes para producir anticuerpos monoclonales. Los andamios de la invención también pueden ser adecuados para producir moléculas orgánicas, tales como aromas, moléculas terapéuticas, etc.

15 Para este fin, los andamios de la invención pueden cargarse con cualquier tipo de células, incluyendo células procariotas y eucariotas. Por ejemplo, los andamios de la invención pueden cargarse con bacterias, células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc. Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, las levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (por ejemplo, células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.), así como cultivos de células de mamífero primarios o establecidos (por ejemplo, producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Más en concreto, la invención contempla el uso de líneas celulares establecidas, tales como hibridomas. Como alternativa, las células puede modificarse genéticamente para que expresen una molécula deseada, tal como se describió anteriormente.

25 El andamio de la invención puede cargarse con células, cultivarse durante un cierto periodo de tiempo, y después las células pueden retirarse/extraerse/separarse del andamio para su posterior uso, tal como en aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico o en análisis celulares. La separación de las células del andamio puede implicar el uso de enzimas que degradan el andamio, tales como pululanasa y/o el uso de enzimas pueden desprender las células, tales como colagenasa, elastasa o tripsina, o disoluciones para desprender las células, tales como EDTA.

La invención se ilustrará más a fondo mediante las siguientes figuras y ejemplos.

30 Figuras.

Figura 1: Aspecto macroscópico de un andamio poroso circular después de la rehidratación.

Figura 2: Observación microscópica mediante ESEM de andamios hidratados porosos como una función de las condiciones del proceso de liofilización (vacío en mbares). Compás de escala: 200 micrómetros, excepto para el aumento grande (50 micrómetros).

35 Figura 3: Observación SEM de andamios secados porosos preparados de 10 Pa (0,1 mBar) (izquierda) a aproximadamente 650 Pa (6,5 mBar) (derecha).

Figura 4: Observación de la tinción H&E de secciones de andamio poroso preparado de 10 Pa (0,1 mBar) a aproximadamente 650 Pa (6,5 mBar) (aumento, x40).

Figura 5: Proporción de hinchamiento como una función de la presión de liofilización.

40 Figura 6: Liberación de norfloxacin desde el andamio poroso, comparado con la liberación desde andamios no porosos preparados sin agente porógeno.

Ejemplos.

Ejemplo 1: Preparación de andamios con una base de polisacáridos.

45 Se preparó una mezcla de pululano/dextrano 75:25 con una concentración total en agua del 24,5% (en p/v) (pululano, PM 200.000, Hayashibara Inc., Okoyama, Japón; dextrano, PM 500.000, Pharmacia). Se realizó la reticulación química de los polisacáridos utilizando el agente reticulante trimetafosfato de sodio (STMP) (al 11% en p/v, Sigma) bajo condiciones alcalinas. Brevemente, 9 ml de la disolución de polisacáridos se mezcló con 1 ml de NaOH 10 M y después se añadieron a la mezcla 300 mg de STMP en 1 ml de agua. La disolución se vertió inmediatamente en una placa Petri de 60 mm y después se conservó a -80 °C. La reticulación se realizó en la
50 mezcla congelada durante un proceso de liofilización en un liofilizador Lyovac (GT2, bomba de aspas rotatorias STERIS, BOC EDWARDS). Los andamios se liofilizaron durante 24 h para permitir la eliminación completa del agua. Los andamios reticulados durante el proceso de liofilización fueron opacos y ligeramente quebradizos. Pueden cortarse con facilidad para obtener el tamaño y la forma deseados, y pueden rehidratarse (figura 1).

Se realizó un experimento control liofilizando andamios obtenidos después de una reticulación química realizada a 50 °C. Sin embargo, estos andamios secados no pudieron rehidratarse bien, puesto que su estructura global se dañó después del proceso de liofilización. Se realizó otro experimento omitiendo el agente reticulante en el proceso. En estas condiciones, el protocolo de liofilización sólo conduce a una disolución y no a un andamio.

5 Ejemplo 2: Influencia de las condiciones de la liofilización.

La preparación de los andamios de polisacáridos se realizó según el ejemplo 1. Para la etapa de liofilización se ajustaron diferentes vacíos (10 Pa (0,1 mBar), 75 Pa (0,75 mBar), 300 Pa (3 mBar), 150 Pa (1,5 mBar), y 650 Pa (6,5 mBar)) utilizando un escape controlado.

Los andamios resultantes se caracterizaron utilizando microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM). La superficie de los andamios en su estado hidratado se observó directamente utilizando un ESEM-FEG (Philips XL 30, Países Bajos, con un voltaje acelerante de 15 kV a una presión de 4 torr), puesto que la técnica de ESEM no requiere la deshidratación de las muestras. Las imágenes de ESEM de los andamios en estado hinchado indican que estos andamios son porosos (figura 2). Los andamios liofilizados a 10 Pa (0,1 mbar) (vacío elevado) presentan poros con diámetros mayores que los preparados a 650 Pa (6,5 mPa) (vacío bajo). Para las condiciones de vacío bajo, la red de los andamios estaba mejor organizada, era homogénea con poros interconectados a través del andamio. Las imágenes de SEM de los andamios secados confirmaron que los andamios reticulados durante el proceso de liofilización eran porosos (figura 3). Para la tinción histológica, los andamios se fijaron en paraformaldehído al 4%/PBS, después se introdujeron en OCT (Tissue Teck-OCT (EMS, Washignton, PA)) y se congelaron en isopentano enfriado en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se criocortaron (secciones de 10 µm) utilizando un criostato (Leica CM 1900). Se realizó una tinción con hematoxilina/eosina sobre las secciones del andamio para visualizar la estructura de los andamios.

El aspecto de los andamios en las secciones histológicas es coherente con las imágenes de microscopía electrónica (figura 4). La estructura porosa interna de los andamios puede modularse variando el vacío de la liofilización. Los andamios reticulados a un vacío bajo (650 Pa (6,5 mBar)) presentan una estructura con poros pequeños, comparado con los andamios reticulados a un vacío elevado (10 Pa (0,1 mBar)) que presentan una red holgada.

25 Ejemplo 3: Proporción de hinchamiento.

La preparación de los andamios de polisacáridos se realizó según el ejemplo 2. Los andamios liofilizados se cortaron con una cuchilla para obtener andamios con forma rectangular (2,5 cm x 2 cm, espesor: 3 mm). Los andamios se lavaron en agua desionizada para eliminar las sales tamponantes, y después se deshidrataron a 50 °C durante 36 horas. Se midió el peso de las muestras en el estado seco (P seco) e hinchado (P hinchado) después de la rehidratación en agua desionizada durante 24 horas utilizando una balanza electrónica (AG 204 Deltarange® Mettler-Toledo; max. 81 g/210 g; d = 0,1 mg/1 mg). Antes de pesar, los andamios hinchados se posaron cuidadosamente sobre un papel suave para eliminar el exceso de agua. Cada experimento se realizó por triplicado. La proporción de hinchamiento se calculó según la fórmula: proporción de hinchamiento = ((P hinchado - P seco)/P seco) x 100.

La proporción de hinchamiento de los andamios porosos aumenta con un aumento en el vacío de liofilización (figura 5). La menor proporción de hinchamiento resultó la correspondiente a los andamios preparados al vacío menor (650 Pa (6,5 mbar)).

Ejemplo 4: Infiltración celular.

40 Se cultivaron células precursoras mesenquimáticas (MSC) de médula ósea femoral de ratas Wistar sobre andamios preparados como en el ejemplo 1. Se utilizó un troquel circular para cortar andamios porosos de forma circular con 6 mm de diámetro y 1 mm de espesor. Antes de sembrar las células se dejó que los andamios se equilibrasen en medio de cultivo en placas de 24 pocillos a 37 °C durante 24 horas. El medio de cultivo consiste en DMEM con bajo contenido en glucosa (Gibco, Life Technology, Nueva York) con suero bovino fetal al 10% y penicilina al 45 1%/estreptomicina (Sigma). Las células se sembraron sobre la parte superior de los andamios (densidad celular de 10⁶ células/andamio). El medio de cultivo, suplementado con ácido ascórbico (50 µg/ml), se cambió cada 2-3 días. Las muestras se mantuvieron en cultivo durante hasta 1 semana. Se emplearon andamios porosos no sembrados incubados en medio de cultivo como controles. Se realizaron con éxito experimentos similares con otros tipos celulares, tales como células del músculo liso vascular primarias y células endoteliales de origen animal y humano.

50 Fijación inicial: Las células se fijaron en menos de 2 horas sobre las superficies de los andamios porosos, infiltrándose las MSC en los andamios.

Detección de las células: Las células se detectaron marcando las células antes de la etapa de siembra con el tinte fluorescente PKH26 (Sigma) según las instrucciones del fabricante. las células se sembraron en los andamios sin marcar y marcados con FITC. Los andamios sembrados después se fijaron en paraformaldehído al 4%/PBS antes del análisis mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 510).

Las MSC marcadas con PKH26 fueron detectadas por los poros del andamio. Se tomaron imágenes representativas

de la distribución celular dentro de los geles a una profundidad de 70 y 190 micrómetros en el día 1 y el día 7. Una proyección del eje z de las imágenes confocales confirmó la infiltración celular dentro del gel. Se advirtió un aumento en la densidad celular dentro de los andamios desde el día 1 al día 7.

5 Viabilidad celular: Se ensayó la viabilidad celular utilizando Calcein AM (Calbiochem, San Diego, CA), que es un tinte polianiónico que es hidrolizado por las células vivas, produciendo con ello una intensa fluorescencia verde uniforme (longitud de onda 485-535 nm). Este tinte se añadió según las instrucciones del fabricante a los andamios porosos no marcados y marcados con FITC en el día 1, día 5 y día 7. Los andamios sembrados entonces se fijaron en paraformaldehído al 4%/PBS antes del análisis mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 510) para visualizar la distribución celular dentro de los andamios y los andamios con FITC.

10 Con este ensayo se confirmó que la mayoría de las células estaban vivas en el día 1 y en el día 7 sobre la superficie y en el interior de los andamios porosos.

Ejemplo 5: Incorporación de proteínas en el interior de los andamios.

15 La preparación de los andamios de polisacáridos se realizó según el ejemplo 1 con las siguientes modificaciones para incorporar proteínas de adhesión, tales como gelatina y colágeno de tipo I. Para la gelatina, se mezclaron 9 ml de disolución de polisacáridos con 1 ml de NaOH 10 M, y después se añadieron a la mezcla 300 mg de STMP en 1 ml de agua que contenía 500 µg de gelatina (500 µl de una disolución de gelatina al 0,1%). La incorporación del colágeno de tipo I se realizó añadiendo 500 µl de una disolución de colágeno al 0,4% (Upstate nº 08115) a la disolución de polisacáridos antes de añadir el agente reticulante (300 mg en 500 µl de tinción de azul de Coomassie y rojo Sirio de secciones gruesas de andamios confirmaron la distribución de las proteínas dentro del andamio). Se calculó que el contenido medio en proteínas era de aproximadamente 1 µg de gelatina por andamio de 6 mm de diámetro, y 4 µg de colágeno por andamio de 6 mm de diámetro.

Ejemplo 6: Andamio tubular como sustituto vascular.

Los andamios tubulares con una base de polisacáridos preparados como se describe en el ejemplo 1 pueden utilizarse como sustitutos vasculares.

25 Una disolución acuosa preparada como se describe en el ejemplo 1 se vertió en un molde tubular casero que consistía en una aguja 20G y una caperuza para la aguja. La aguja (20G x 1 ^{1/2}" o 0,9 x 40 mm) se empleó como eje central para crear la superficie lisa del lumen (diámetro del lumen 2 mm). La disolución de polisacárido/STMP se inyectó en la aguja a través de la caperuza de la aguja utilizando una jeringa de 1 ml. El diámetro interno y externo del andamio tubular resultante depende del tamaño de la aguja y su caperuza (también se prepararon muestras utilizando agujas 18G o 21G).

30 Según el ejemplo 1, el molde se congeló inmediatamente a -80 °C. En segundo lugar, la mezcla se liofilizó según se describió anteriormente. Después de la liofilización, los andamios se retiraron con facilidad del molde. Después de una rehidratación en PBS se obtuvieron moldes con forma tubular. Pueden sembrarse células, tales como células del músculo liso o células precursoras mesenquimáticas, en el andamio tubular durante el proceso de rehidratación, y después pueden cargarse otras células, tales como células endoteliales o células precursoras endoteliales, en el lumen del andamio tubular.

Ejemplo 7: Incorporación de fármaco a los andamios.

40 La preparación de los andamios de polisacáridos se realizó según el ejemplo 1 con las siguientes modificaciones para incorporar fármacos, tales como norfloxacina. La norfloxacina, un ácido carboxílico de fluoroquinolona, es un agente antimicrobiano ampliamente utilizado. En la actualidad se considera un compuesto modelo de baja biodisponibilidad, principalmente atribuida a su baja solubilidad acuosa. La norfloxacina (Sigma) se añade en estado sólido (60 mg) a la disolución de polisacáridos (10 g), y la mezcla se agita hasta lograr la homogeneidad. La mezcla resultante después se mezcla con 1 ml de NaOH 10 M, y después se añaden a la mezcla 300 mg de STMP en 1 ml de agua. Entonces se realiza el proceso de reticulación según el ejemplo 1.

45 Se obtuvieron perfiles de liberación mediante la incubación de andamios porosos en PBS a 37 °C durante hasta 24 horas. Se ensayó el contenido en norfloxacina en los sobrenadantes de modo espectrofotométrico a 274 nm. La figura 6 ilustra la liberación de norfloxacina desde el andamio poroso, comparado con la liberación desde andamios no porosos preparados sin agente porógeno.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para preparar un andamio poroso, que comprende las etapas que consisten en:
- a) preparar una disolución acuosa alcalina que comprende una cantidad de al menos un polisacárido y un agente reticulante;
- 5 b) congelar la disolución acuosa de la etapa a);
- c) sublimar la disolución congelada de la etapa b);
- que se caracteriza porque la reticulación del polisacárido se produce durante la etapa de sublimación c).
- 2.- El método de la reivindicación 1, en el que dicho polisacárido se selecciona del grupo que consiste en dextrano, agar, ácido alginico, ácido hialurónico, inulina, pululano, heparina, quitosano, y fucoidano.
- 10 3.- El método según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho agente reticulante se selecciona del grupo que consiste en trimetafosfato de trisodio (STMP), oxiclورو de fósforo (POCl₃), epíclorohidrina, formaldehídos, carbodiimidas hidrosolubles, y glutaraldehídos.
- 4.- El método según la reivindicación 3, en el que dicho agente reticulante es trimetafosfato de sodio (STMP).
- 15 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la disolución acuosa de la etapa a) se liofiliza.
- 6.- El método según la reivindicación 5, en el que la disolución acuosa de la etapa a) se liofiliza bajo una presión de 10 Pa (0,1 mBar) a 650 Pa (6,5 mBar).
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende otra etapa que consiste en rehidratar el andamio obtenido en la etapa c).
- 20 8.- Un andamio poroso que puede obtenerse mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 9.- El andamio poroso de la reivindicación 8, en el que el tamaño de los poros es de entre 1 μm y 500 μm.
- 10.- El andamio poroso según la reivindicación 8 o 9, en el que la porosidad es de entre 4% y 50%.
- 11.- El andamio poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que se caracteriza porque está cargado con una cantidad de células, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en células de levadura, células de mamífero, células de insecto, y células vegetales.
- 25 12.- El andamio poroso según la reivindicación 11, en el que las células son células de mamífero seleccionadas del grupo que consiste en condrocitos; fibrocondrocitos; osteocitos; osteoblastos; osteoclastos; células musculares; sinoviocitos; células de la médula ósea; células mesenquimáticas; células epiteliales; hepatocitos; células estromáticas; células precursoras; células precursoras embrionarias; células precursoras derivadas de tejido adiposo; células progenitoras de sangre periférica; células precursoras aisladas de tejido adulto; y células genéticamente transformadas.
- 30 13.- El andamio poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para la ingeniería de tejidos, el cultivo celular tridimensional, o el transporte de células para un uso terapéutico.
- 14.- Un sustituto vascular fabricado con un andamio según se define según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
- 35 15.- Implantes de cartílago o de hueso fabricados con un andamio según se define según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
- 16.- El uso de un andamio según se define según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 para la evaluación de la toxicidad y/o la farmacología de un producto.
- 40 17.- Un sistema de liberación controlada de un agente activo fabricado con un andamio según se define según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

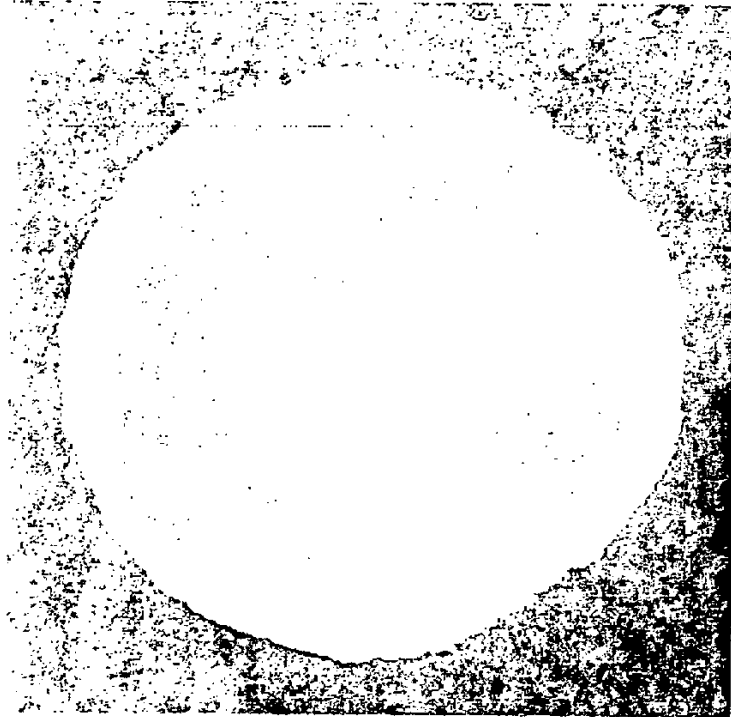


Figura 1

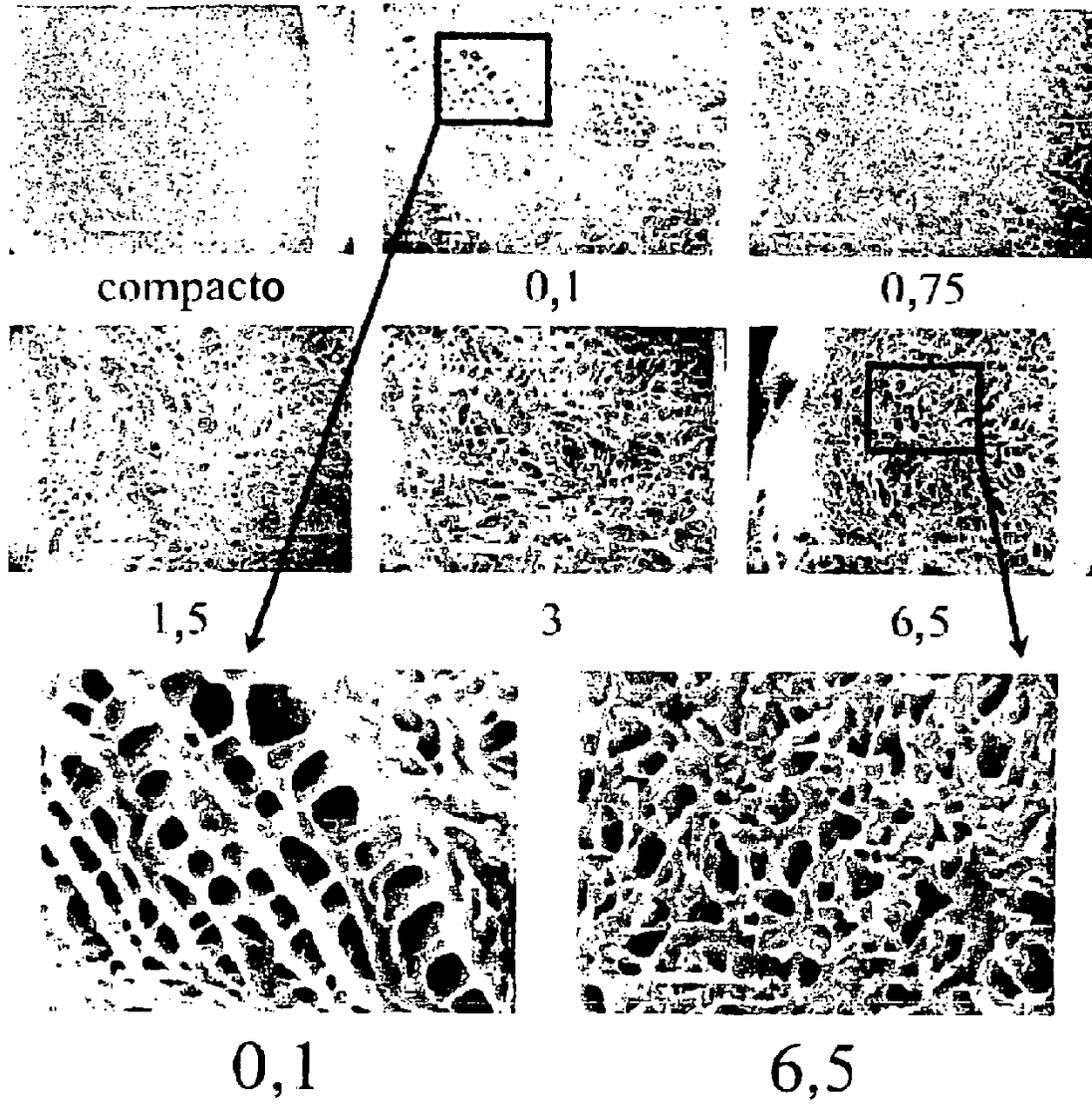


Figura 2

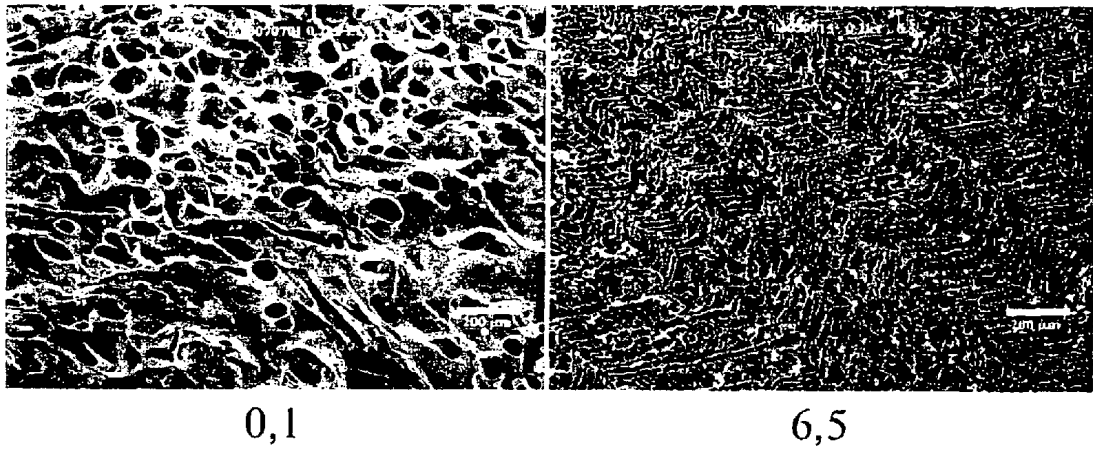


Figura 3

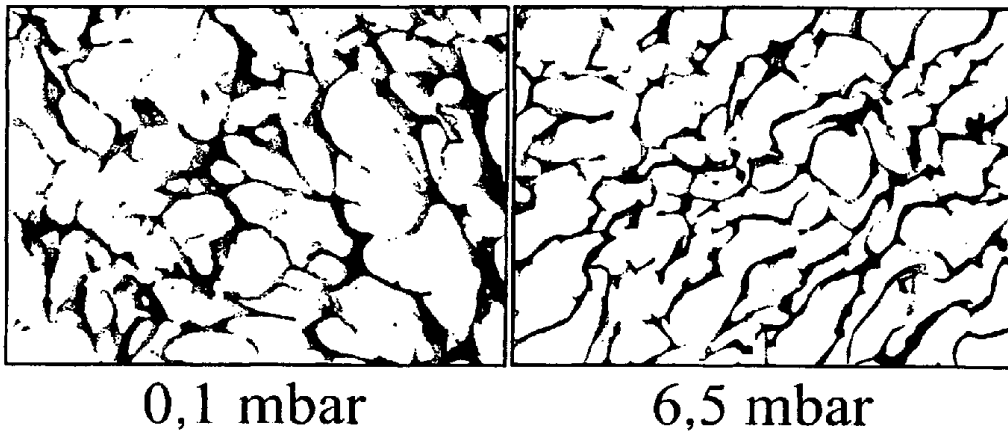


Figura 4

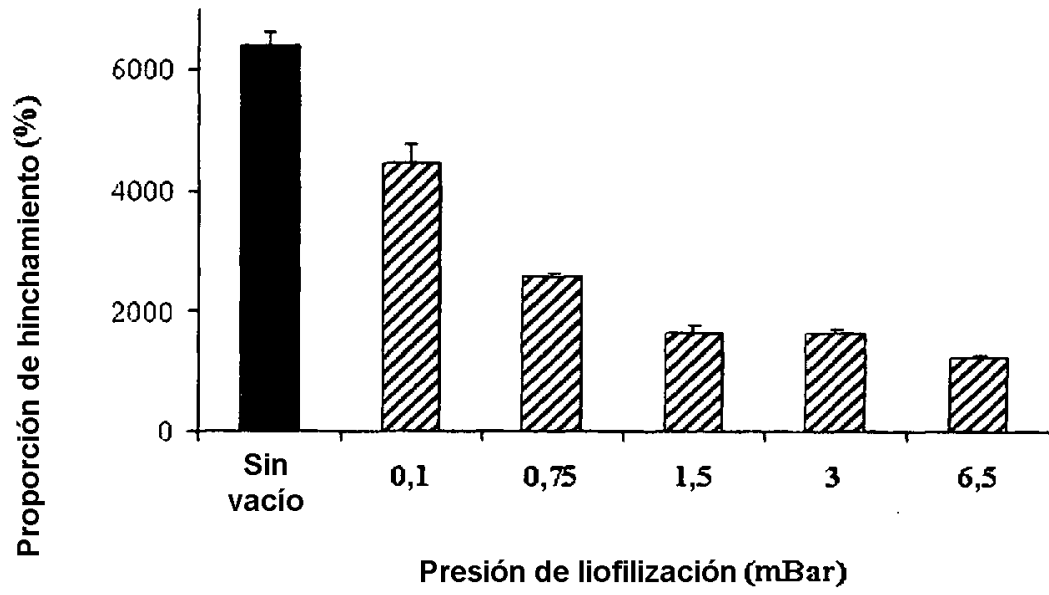


Figura 5

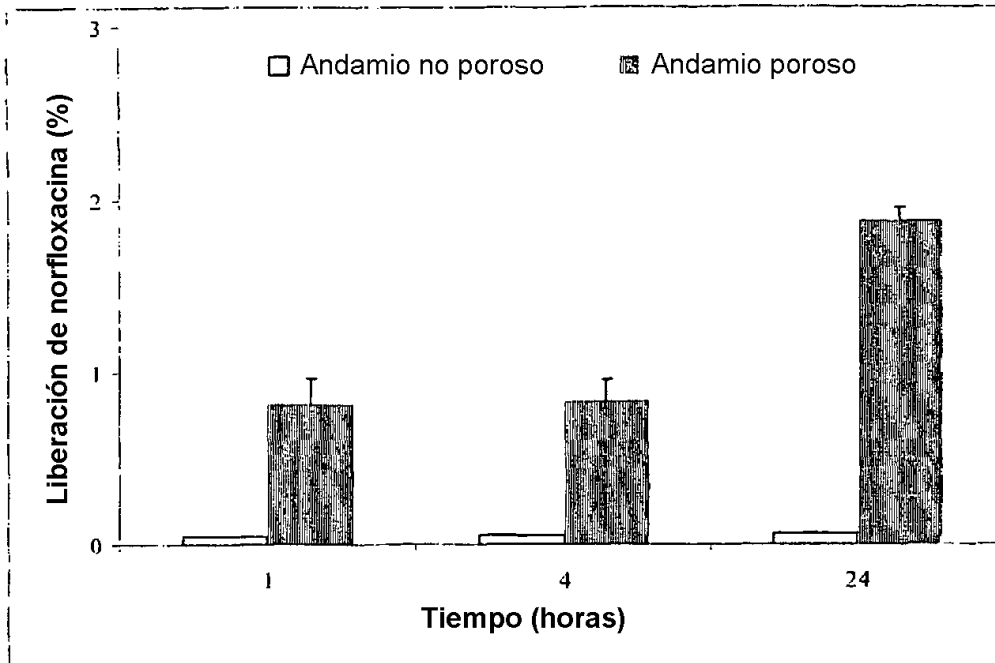


Figura 6