

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 554**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2008 E 08838297 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2013 EP 2203194**

54 Título: **Método para preparar armazón poroso para ingeniería de tejidos, cultivo celular y suministro de células**

30 Prioridad:

**11.10.2007 EP 07301452**

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

**21.06.2013**

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ 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 y**  
**LETOURNEUR, DIDIER**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 408 554 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

Método para preparar armazón poroso para ingeniería de tejidos, cultivo celular y suministro de células.

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para preparar un armazón poroso para ingeniería de tejidos. Es otro objeto de la presente invención proporcionar un armazón poroso obtenible por el método como se describió anteriormente y su uso para ingeniería de tejidos, cultivo celular y suministro de células.

### Antecedentes de la invención

10 La ingeniería de tejidos se define en general como la creación de equivalentes de tejidos u órganos por siembra de células sobre o en un armazón adecuado para implante. Los armazones deben ser compatibles y las células deben ser capaces de unirse y proliferar en los armazones para que formen equivalentes de tejidos u órganos. Estos armazones se pueden considerar, por lo tanto, como sustratos para crecimiento celular in vitro o in vivo.

15 Los atributos de un armazón biocompatible ideal incluirían la capacidad para soportar crecimiento celular in vitro o in vivo, la capacidad para soportar el crecimiento de una amplia variedad de tipos de células o linajes, la capacidad para estar dotado de grados variables de flexibilidad o rigidez requerida, la capacidad para presentar grados variables de biodegradabilidad, la capacidad para ser introducido en el sitio deseado in vivo sin provocar un daño secundario y la capacidad para servir como vehículo o depósito para suministro de fármacos o sustancias bioactivas al sitio de acción deseado.

20 Se ha utilizado una serie de diferentes materiales de armazón, para regeneración de tejido guiada y/o como superficies biocompatibles. Los materiales poliméricos biodegradables se prefieren en muchos casos puesto que el armazón se degrada con el tiempo y finalmente la estructura del armazón celular es reemplazada completamente por las células. Entre los muchos candidatos que pueden servir como armazones útiles reivindicados para soportar crecimiento o regeneración de tejidos, se incluyen geles, espumas, láminas y numerosas estructuras en forma de partículas porosas de diferentes formas y conformaciones.

25 Entre los polímeros naturales colectores que se ha descrito que son útiles para ingeniería o cultivo 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 comunes que se usaron incluyen poli(lactida-co-glicolida) (PLG). PLG son polímeros hidrolíticamente degradables que son homologados por la FDA para uso en el cuerpo y mecánicamente fuertes (Thomson RC, Yaszemski MJ, Powers JM, Mikos AG. Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. Ed. J Biomater Sci Polym 1.995; 7 (1): 23-38; Wong WH, Mooney DJ. Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering. En: autores Atala A, Mooney DJ; autores asociados Langer R, Vacanti JP. Synthetic biodegradable polymer scaffolds. Boston: Birkhäuser: 1.997. pág. 51-82). Sin embargo, son hidrófobos y se tratan típicamente en condiciones relativamente estrictas, que hace  
35 potencialmente un reto la incorporación de factor y la inclusión de células viables.

40 Como una alternativa, una variedad de hidrogeles, se ha usado una clase de materiales poliméricos altamente hidratados (contenido en agua mayor que 30% en peso) como materiales de armazón. Están constituidos por cadenas poliméricas hidrófilas, que son de origen sintético o natural. La integridad estructural de los hidrogeles depende de las reticulaciones formadas entre cadenas poliméricas por diversos enlaces químicos e interacciones físicas.

45 Por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.586.246 B1 ha desvelado un método para preparar un armazón de hidrogel poroso que se puede usar como soportes para ingeniería de tejidos o matrices de cultivo. El método del documento comprende las etapas que consisten en: a) disolver un polímero sintético biodegradable en un disolvente orgánico para preparar una disolución polimérica de alta viscosidad b) añadir un agente porógeno a esta disolución; c) moldear el polímero en un molde d) retirar el disolvente orgánico e) sumergir el polímero sin disolvente orgánico / suspensión de gel de sal en una disolución acuosa caliente o disolución ácida para causar que la sal experimente efervescencia a temperatura ambiente para formar el armazón poroso. Sin embargo, este método de preparación de un hidrogel poroso implica el uso de un disolvente orgánico con un polímero sintético que hace el método según esta invención poco compatible con fines biológicos y terapéuticos.

50 La patente de EE.UU. 5840777 desvela un método para producir una espuma de polisacárido tal como quitosán, reticulándolo con glutaraldehído, añadiendo un agente de formación de espuma tal como carbonato de calcio y usándolo como un apósito de herida o como un implante que contiene células.

55 La patente europea EP 1166987 desvela métodos para producir espumas biocompatibles con una superficie microestructurada dispuesta sobre al menos una superficie de la espuma, que proporciona una plantilla que facilita la organización celular y la regeneración de tejido. El método comprende la etapa de poner en contacto una disolución

de polímeros con una superficie de un molde.

5 La patente de EE.UU. 2006/0153814 desvela un método para producir una matriz porosa, que comprende proporcionar una pluralidad de partículas que contienen un catión multivalente, mezclar las partículas con polisacáridos reticulados iónicos y agua para formar una mezcla, introducir un reticulador para solidificar la mezcla, disolver las partículas de la mezcla en un ácido para formar una estructura porosa y neutralizar y reticular la estructura porosa para obtener la matriz porosa.

Por lo tanto, aún hay una necesidad existente en la técnica de desarrollar un método para preparar matrices de armazón poroso que se puedan usar para fines biológicos y terapéuticos.

#### Sumario de la invención

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

a) preparar una disolución acuosa alcalina que comprende una cantidad de al menos un polisacárido, una cantidad de un agente de reticulación y una cantidad de un agente porógeno.

15 b) transformar la disolución en un hidrogel poniendo dicha disolución a una temperatura de aproximadamente 4°C a aproximadamente 80°C durante un tiempo suficiente para permitir la reticulación de dicha cantidad de polisacárido y

c) sumergir dicho hidrogel en una disolución acuosa

d) lavar el armazón poroso obtenido en la etapa c).

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un armazón poroso obtenible por el método como se describió en la reivindicación 4.

20 Es otro objeto más de la presente invención proporcionar el uso de armazón poroso de la invención para ingeniería de tejidos, cultivo celular y suministro celular.

#### Descripción detallada de la invención

Definiciones:

25 El término "polisacárido", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula que comprende dos o más unidades monosacárido.

El término "disolución alcalina", como se usa en la presente memoria, indica una disolución con un pH superior a 7.

El término "disolución ácida", como se usa en la presente memoria, indica una disolución con un pH inferior a 7.

El término "disolución acuosa", como se usa en la presente memoria, se refiere a una disolución en que el disolvente es agua.

30 El término "reticulación" se refiere a la unión de una cadena polimérica a otra con enlaces covalentes.

El término "agente porógeno" indica cualquier agente sólido que tiene la capacidad de formar poros dentro de una estructura sólida.

35 Como se usa en la presente memoria, un "armazón" se define como un sistema semisólido que comprende una red tridimensional de una o más especies de cadenas de polisacárido. Dependiendo de las propiedades del polisacárido (o polisacáridos) usado, así como de la naturaleza y densidad de la red, dichas estructuras en equilibrio pueden contener diversas cantidades de agua.

El término "agente de reticulación" incluye cualquier agente capaz de introducir reticulación entre las cadenas de los polisacáridos de la invención.

40 "Biodegradable", como se usa en la presente memoria, se refiere a materiales que se degradan in vivo a compuestos no tóxicos, que pueden ser excretados o metabolizados adicionalmente.

Armazones porosos y método para preparar los mismos:

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

45 a) preparar una disolución acuosa alcalina que comprende una cantidad de al menos un polisacárido, una cantidad de un agente de reticulación covalente y una cantidad de un agente porógeno

b) transformar la disolución en un hidrogel poniendo dicha disolución a una temperatura de 4°C a 80°C durante un tiempo suficiente para permitir la reticulación de dicha cantidad de polisacárido y

c) sumergir dicho hidrogel en una disolución acuosa

d) lavar el armazón poroso obtenido en la etapa c).

5 En la presente invención, se puede usar cualquier tipo de polisacárido. Los polisacáridos sintéticos o naturales se pueden usar alternativamente para el fin de la invención. Por ejemplo, los polisacáridos naturales adecuados incluyen, pero no se limitan a, dextrano, agar, ácido algínico, ácido hialurónico, inulina, pululano, heparina, fucoidán, quitosán, escleroglucano, curdlan, almidón, celulosa y mezclas de los mismos. Los monosacáridos que se pueden usar para producir el polisacárido deseado incluyen, pero no se limitan a, ribosa, glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sorbosa, sorbitol, manitol, iditol, dulcitol y mezclas de los mismos. Se pueden incluir polisacáridos modificados de manera química que soporten por ejemplo grupos ácidos (carboxilato, sulfato, fosfato), grupos amino (etilenamina, dietilamina, dietilaminoetilamina, propilamina), grupos hidrófobos (alquilo, bencilo). Muchos de estos compuestos están comercialmente disponibles en compañías tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, Michigan, US).

10 El peso molecular medio ponderal 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.

15 En una realización de la invención, el polisacárido o los polisacáridos usados para preparar el armazón de la invención es un polisacárido neutro tal como dextrano, agar, pululano, inulina, escleroglucano, curdlan, almidón, celulosa o una mezcla de los mismos. En una realización preferida, se usa una mezcla de pululano y dextrano para preparar el armazón de la invención. Por ejemplo, dicha mezcla comprende 25% de dextrano y 75% de pululano.

20 En otra realización de la invención, el polisacárido o los polisacáridos usados para preparar el armazón de la invención es un polisacárido cargado de manera positiva tal como quitosán, DEAE-dextrano y mezclas de los mismos.

25 En otra realización de la invención, el polisacárido o los polisacáridos usados para preparar el armazón de la invención es un polisacárido cargado de manera negativa tal como ácido algínico, ácido hialurónico, heparina, fucoidán y mezclas de los mismos.

30 En otra realización de la invención, el polisacárido o los polisacáridos usados para preparar el armazón de la invención es una mezcla de polisacáridos neutros y cargados de manera negativa, en los que los polisacáridos cargados de manera negativa representan 1 a 20%, preferiblemente 5 a 10% de la mezcla.

35 En una realización particular, el agente de reticulación covalente es seleccionado del grupo que consiste en: trimetafosfato trisódico (STMP), oxiclóruo de fósforo (POCl<sub>3</sub>), epíclorohidrina, formaldehídos, carbodiimidas hidrosolubles, glutaraldehídos o cualquier otro compuesto que sea adecuado para la reticulación de un polisacárido. En una realización preferida, el agente de reticulación es STMP. La concentración del agente de reticulación covalente en la disolución acuosa (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 usar el agente de reticulación en tal cantidad que la relación en peso del polisacárido al agente de reticulación esté en el intervalo de 20:1 a 1:1, preferiblemente de 15:1 a 1:1 y más preferiblemente de 10:1 a 1:1.

40 Muchos de estos compuestos están comercialmente disponibles en compañías tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, Michigan, US).

45 La disolución acuosa que comprende el polisacárido puede comprender además diversos aditivos dependiendo de la aplicación deseada. Preferiblemente, el aditivo es compatible con el polisacárido y no interfiere con la reticulación eficaz del polisacárido o de los polisacáridos. La cantidad del aditivo usada depende de la aplicación particular y se puede determinar fácilmente por un experto en la materia usando experimentación de rutina.

50 La disolución acuosa que comprende el polisacárido puede incluir opcionalmente al menos un agente antimicrobiano. Los conservantes antimicrobianos adecuados son conocidos en la técnica. Ejemplos de antimicrobianos adecuados incluyen, pero no se limitan a, alquilparabenos, tales como metilparabén, etilparabén, propilparabén y butilparabén; cresol; clorocresol; hidroquinona; benzoato de sodio; benzoato de potasio; triclosán y clorhexidina. Otros ejemplos de agentes antibacterianos y de agentes anti-infecciosos que se pueden usar son, de una manera no limitante, rifampicina, minociclina, clorhexidina, agentes de iones plata y composiciones a base de plata.

La disolución acuosa que comprende el polisacárido también puede incluir opcionalmente al menos un colorante para aumentar la visibilidad de la disolución. Colorantes adecuados incluyen tintes, pigmentos y agentes colorantes naturales. Ejemplos de colorantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, azul alcian, isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) y FITC-dextrano.

La disolución acuosa que comprende el polisacárido también puede incluir opcionalmente al menos un tensioactivo. Tensioactivo, como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto que reduce la tensión superficial de agua. El tensioactivo puede ser un tensioactivo iónico, tal como laurilsulfato de sodio, o un tensioactivo neutro, tal como éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno y polioxietileno sorbitán.

- 5 En una realización particular, el agente porógeno puede ser un agente que se puede transformar en un gas en condiciones ácidas, formándose poros por las moléculas de dióxido de carbono que lixivian del polímero. Ejemplos de dicho agente porógeno incluyen, pero no se limitan a, carbonato de amonio, bicarbonato de amonio, carbonato de sodio y bicarbonato de sodio, carbonato de calcio y mezclas de los mismos. Se prefiere usar el agente porógeno en tal cantidad que la relación en peso del polisacárido al agente porógeno esté en el intervalo de 6:1 a 1:1, preferiblemente de 4:1 a 1:1, más preferiblemente a 2:1 a 1:1. Muchos de estos compuestos están comercialmente disponibles en compañías tales como Sigma-Aldrich (St. Louis, Michigan, US). En una realización, la relación del polisacárido al agente porógeno puede estar en el intervalo de 6:1 a 0,5:1, preferiblemente de 4:1 a 0,5:1, más preferiblemente a 2:1 a 0,5:1. En otra realización, aunque el polisacárido es un polisacárido cargado de manera positiva, la relación del polisacárido al agente porógeno puede estar en el intervalo de 50:1 a 1:1, preferiblemente de 20:1 a 1:1 y más preferiblemente de 10:1 a 1:1.

En esta realización particular, la disolución acuosa de la etapa c) es una disolución ácida. El ácido puede ser seleccionado del grupo que consiste en: ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fórmico, ácido tartárico, ácido salicílico, ácido benzoico y ácido glutámico.

- 20 Alternativamente, el agente porógeno puede ser una sal inorgánica que se puede disolver una vez que el armazón de polisacárido reticulado se sumerge en agua. Un ejemplo de dicho agente porógeno incluye disolución saturada de sal, que se disolvería progresivamente. En esta realización particular, la disolución acuosa de la etapa c) es una disolución acuosa, preferiblemente agua y más preferiblemente agua destilada.

La concentración del agente porógeno afecta al tamaño de los poros formados en los armazones, a fin de que el tamaño de poro pueda estar bajo el control de la concentración de dicho agente porógeno.

- 25 El tamaño de poro medio del armazón es de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 500  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de aproximadamente 150  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 350  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente de aproximadamente 175  $\mu\text{m}$  a aproximadamente 300  $\mu\text{m}$ . La densidad de los poros o porosidad es de aproximadamente 4% a aproximadamente 75%, preferiblemente de aproximadamente 4% a aproximadamente 50%.

- 30 En otra realización, el método de la invención puede comprender una etapa adicional que consiste en liofilizar el armazón obtenido en la etapa d). La liofilización se puede realizar con cualquier aparato conocido en la técnica. Hay esencialmente tres categorías de liofilizadores: evaporadores rotatorios, liofilizadores colectores y liofilizadores de bandeja. Dichos aparatos son conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles tal como un liofilizador Lyovac (GT2, bomba de álabes rotatoria STERIS, BOC EDWARDS). Básicamente, 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 retirar al menos 98,5% del agua, preferiblemente al menos 99% del agua, más preferiblemente al menos 99,5%.

- 35 En otra realización, el método de la invención puede comprender una etapa adicional que consiste en hidratar el armazón cuando se prepara según la invención. Dicha hidratación se puede realizar sumergiendo el armazón en una disolución acuosa (por ej., agua desionizada, agua filtrada por ósmosis inversa, una disolución salina o una disolución acuosa que contiene un ingrediente activo adecuado) durante una cantidad de tiempo suficiente para producir un armazón con el contenido en agua deseado. Por ejemplo, cuando se desea un armazón que comprende el máximo contenido en agua, el armazón se sumerge en la disolución acuosa durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir que el armazón se hinche a su máximo tamaño o volumen. Típicamente, el armazón se sumerge en la disolución acuosa durante al menos aproximadamente 1 hora, preferiblemente al menos aproximadamente 2 horas y más preferiblemente aproximadamente 4 horas a aproximadamente 24 horas. Se entiende que la cantidad de tiempo necesaria para hidratar el armazón al nivel deseado dependerá de diversos factores, tales como la composición de los polisacáridos usados, el tamaño (por ej., espesor) del armazón y la temperatura de la disolución acuosa, así como otros factores.

En una realización particular, el armazón hidratado comprende 80% de agua, preferiblemente 90% de agua, lo más preferiblemente 95% de agua.

- 50 En otra realización particular, la disolución acuosa de la etapa a) puede ser vertida en un molde antes de la etapa b), a fin de que el armazón poroso obtenido con el método de la invención pueda tomar una forma deseada. Se puede usar cualquier molde geométrico según la invención. También se pueden prever diferentes tamaños. Por ejemplo, típicamente, la disolución acuosa puede ser vertida en un molde tubular con un eje central a fin de que el armazón poroso pueda ser tubular con un diámetro externo e interno deseado. El molde se puede fabricar de cualquier material, pero el material preferido incluye superficies no pegajosas tales como Teflón.

Alternativamente, los armazones de la invención se pueden cortar y conformar para tomar un tamaño y forma deseados.

Los métodos de la invención pueden incluir además la etapa de esterilizar el almacén usando cualquier procedimiento adecuado. El almacén puede ser esterilizado en cualquier punto adecuado, pero se esteriliza preferiblemente antes de que se hidrate el almacén. Una técnica de esterilización por radiación adecuada es por ejemplo una irradiación con Cesio 137, 35 Gray durante 10 minutos. Las técnicas de esterilización no por radiación adecuadas incluyen, pero no se limitan a, métodos de exposición a UV, plasma gaseoso o de óxido de etileno conocidos en la técnica. Por ejemplo, el almacén se puede esterilizar usando un sistema de esterilización que esté disponible en Abtox, Inc de Mundelein, Illinois con la marca registrada PlazLyte o según los procedimientos de esterilización de plasma gaseoso desvelados en las patentes de EE.UU. 5413760 y 5603895.

El almacén producido por los métodos de la invención se puede envasar en cualquier material de envasado adecuado. Deseablemente, el material de envasado mantiene la esterilidad del almacén hasta que se rompe el material de envasado.

En otra realización, se puede incorporar una o más biomoléculas en el almacén poroso. Las biomoléculas pueden comprender, en otras realizaciones, drogas, hormonas, antibióticos, sustancias antimicrobianas, tintes, sustancias radiactivas, sustancias fluorescentes, sustancias antibacterianas, productos químicos o agentes, incluyendo cualquier combinación de los mismos. Las sustancias se pueden usar para mejorar los efectos del tratamiento, aumentar la visualización, indicar la orientación apropiada, resistir a la infección, activar la curación, aumentar la suavidad o cualquier otro efecto deseado. En dicha realización, el almacén de la invención, que comprende una o más biomoléculas como se describió en la presente memoria anteriormente, se puede usar como un sistema de liberación controlada de un agente activo.

El almacén producido por los métodos de la invención está exento de factores de crecimiento y otros estimulantes del crecimiento. En una realización, la biomolécula puede comprender agentes quimiotácticos, antibióticos, analgésicos esteroideos o no esteroideos, antiinflamatorios, inmunodepresores, fármacos anti-cáncer, diversas proteínas (por ej., péptidos de cadena corta, proteínas morfogénicas óseas, glicoproteína y lipoproteína); mediadores de unión celular; ligandos biológicamente activos; secuencia de unión de integrina; ligandos; diversos agentes de crecimiento y/o diferenciación (por ej., factor de crecimiento epidérmico, IGF-I, IGF-II, TGF- $\beta$ ), factores de crecimiento y diferenciación, factor SDF-1 derivado del estroma; factores de crecimiento endotelial vascular, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento procedentes de plaquetas, factor de crecimiento procedente de insulina y factores de crecimiento de transformación, hormona paratiroidea, péptido relacionado con la hormona paratiroidea, bFGF; factores de la superfamilia TGF $\beta$ ; BMP-2; BMP-4; BMP-6; BMP-12; erizo sónico; GDF5; GDF6; GDF8; PDGF); pequeñas moléculas que afectan la regulación hacia arriba de los factores de crecimiento específicos; tenascina-C; ácido hialurónico; sulfato de condroitina; fibronectina; decorina; tromboelastina; péptidos procedentes de trombina; dominios de unión a heparina; heparina; heparán sulfato; fragmentos de ADN, plásmidos de ADN, Si-ARN, agentes transinfección o cualquier combinación de los mismos.

En una realización los factores de crecimiento incluyen factor de crecimiento de unión a heparina (HBGF), factor de crecimiento de transformación alfa o beta (TGF $\beta$ ), factor de crecimiento fibroblástico alfa (FGF), factor de crecimiento epidérmico (TGF), factor de 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 ser deseable incorporar factores tales como factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) o factor morfogénico muscular (MMF, por sus siglas en inglés). En una realización, se incorporan TNF alfa/beta o Metaloproteinasas de matriz (las MMP, por sus siglas en inglés).

Adicionalmente, los almacenes de la invención pueden incluir opcionalmente agentes antiinflamatorios, tales como indometacina, acetato - ácido salicílico, ibuprofeno, sulindaco, piroxicam y naproxeno; agentes trombogénicos, tales como trombina, fibrinógeno, homocisteína y estamustina y compuestos radiopacos, tales como sulfato de bario, partículas de oro y nanopartículas de óxido de hierro (las USPIO).

Adicionalmente, los almacenes de la invención pueden comprender opcionalmente agentes antitrombóticos tales como antivitamina K o aspirina, agentes antiplaquetarios tales como aspirina, tienopiridina, dipiridamol o clopidogrel (que inhibe de manera selectiva y de manera irreversible agregación de plaquetas inducida por adenosina difosfato (ADP)) o agente anticoagulante tal como heparina o fucoidán. La combinación de heparina (anticoagulante) y tirofiban (agente antiplaquetario) se ha demostrado eficaz en la reducción tanto de trombo como tromboembólico y se pueden incorporar. La genisteína, una isoflavona potencial que posee propiedades antiplaquetas y antiproliferativas dependientes de la dosis e inhibe la agregación plaquetaria inducida por colágeno responsable de trombosis primaria, también se puede incorporar.

Métodos para usar los almacenes de la invención:

Los almacenes de la invención son adecuados especialmente para ingeniería de tejidos, reparación o regeneración. Una diferencia en porosidad puede facilitar la migración de diferentes tipos de células a las regiones apropiadas del almacén. En otra realización, una diferencia en porosidad puede facilitar el desarrollo de conexiones célula a célula apropiadas entre los tipos de células que comprende el almacén, requeridos para la estructuración apropiada del tejido de desarrollo/reparación/regeneración. Por ejemplo, la extensión de los procesos celulares se puede adaptar más apropiadamente vía la porosidad variada del material de almacén. Por lo tanto, el almacén puede comprender

células de cualquier tejido.

En una realización particular, las células se siembran sobre dicho armazón. En otra realización, los armazones de la invención se sumergen en una disolución de cultivo que comprende las células deseadas durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir la penetración de las células por el armazón.

- 5 En otra realización, el armazón de la invención es capaz de soportar la viabilidad y el crecimiento de células sembradas en cultivo durante periodos de tiempo prolongados sin inducir diferenciación.

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

- 10 En otra realización, el armazón de la invención se puede usar para estudiar procesos fisiológicos y patológicos tales como crecimiento de tejidos, reestructuración ósea, curación de heridas, tumorigénesis (incluyendo migración e invasión), diferenciación y angiogénesis. El armazón permite la creación de entornos definidos y controlados donde se pueden modular y estudiar procesos específicos de una manera controlada sin factores endógenos.

- 15 En particular, el armazón de la invención se puede usar para cultivo 3D para dosis de diagnóstico o toxicológicas. En esta realización, el armazón de la invención permitiría la evaluación de la toxicidad de un producto directamente sobre células presentes en un entorno 3D. En dicha realización, el armazón de la invención se usa para cultivar células útiles para la evaluación de la toxicidad y/o farmacología de un producto, tales como hepatocitos, células madre embrionarias, células epiteliales, queratinocitos o células madre pluripotentes inducidas (células iPS, por sus siglas en inglés).

- 20 En otra realización, el armazón de la invención es capaz de soportar crecimiento y diferenciación de tipos de células in vitro e in vivo.

- En otra realización, las células son células madre o progenitoras. En otra realización las células pueden incluir, pero no se limitan a, condrocitos; fibrocondrocitos; osteocitos; osteoblastos; osteoclastos; sinoviocitos; células de médula ósea; células mesenquimales: células epiteliales, hepatocitos, células musculares; células estromales; células madre; células madre embrionarias; células precursoras procedentes de tejido adiposo; células progenitoras de sangre periférica; células madre aisladas de tejido adulto; células madre pluripotentes inducidas (células iPS); células transformadas de manera genética; 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 mesenquimatosas y otras células; una combinación de células estromales y otras células; una combinación de células madre y otras células; una combinación de células madre embrionarias y otras células; una combinación de células progenitoras aisladas de tejido adulto y otras células; una combinación de células progenitoras de sangre periférica y otras células; una combinación de células madre aisladas de tejido adulto y otras células y una combinación de células transformadas de manera genética y otras células.
- 25  
30

- En otra realización, cualquiera de estas células para uso en los armazones y los métodos de la invención, puede ser lograda por ingeniería genética para expresar una molécula deseada, tal como por ejemplo proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés), gen indicador (luciferasa, fosfatasa alcalina), factor de crecimiento de unión a heparina (HBGF), factor de crecimiento de transformación alfa o beta (TGF.beta.), factor de crecimiento fibroblástico alfa (FGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento epidérmico (TGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) y SDF-1, algunos de los cuales son también factores angiogénicos. En otra realización, los factores expresados incluyen hormonas tales como insulina, glucagón y estrógeno. En otra realización, se expresan factores tales como factor de crecimiento nervioso (NGF, por sus siglas en inglés) o factor morfogénico muscular (MMF, por sus siglas en inglés) o en otra realización, TNF alfa/beta.
- 35  
40

- En una realización particular, los armazones de la invención son adecuados para preparar sustitutos vasculares para reemplazar arterias comprometidas como 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. Nov 2.006; 27 (32): 5.546-53. Epub 20 de Jul. de 2.006). Dichos sustitutos se pueden preparar según los métodos de la invención usando un molde como se describió anteriormente. Dichos sustitutos pueden comprender después una población de células para reconstruir in vitro o in vivo un vaso. En otra realización, las células pueden incluir, pero no se limitan a, Células Madre Mesenquimales (MSC, por sus siglas en inglés), Células Progenitoras Epiteliales (las EPC, por sus siglas en inglés), células endoteliales, células fibroblásticas y células de músculo liso.
- 45  
50

En otra realización particular, los armazones de la invención son adecuados para preparar cartílago o implantes óseos. De tal manera, los armazones de la invención pueden ser cargados con condrocitos, osteocitos; osteoblastos; osteoclastos; células vasculares o mezclas de los mismos y se pueden cultivar en presencia de agentes de diferenciación.

- 55 El sitio de implantación depende de la enfermedad/tejido dañado que requiere tratamiento. Por ejemplo, para tratar defectos estructurales en cartílago articular, menisco y hueso, el armazón de material compuesto sembrado de células se pondrá en el sitio del defecto para fomentar la reparación del tejido dañado.

En el caso de lesiones del sistema nervioso central (SNC), el almacén de material compuesto se puede sembrar con una combinación de células madre neuronales adultas, células madre embrionarias, células gliales y células de Sertoli. En la realización preferida, el almacén de material compuesto se puede sembrar con células de Sertoli procedentes de estirpes celulares transformadas, fuentes xenogénicas o alogénicas junto con células madre neuronales. Las células de Sertoli se pueden cultivar con el almacén de material compuesto durante un periodo antes de la adición de células madre y posterior implantación en el sitio de la lesión. Esta propuesta puede evitar uno de los mayores obstáculos del tratamiento celular para aplicaciones del SNC, es decir la supervivencia de las células madre después de trasplante. Un almacén de material compuesto que atrape un gran número de células de Sertoli puede proporcionar un entorno que es más susceptible de supervivencia de células madre.

De acuerdo con esto, el almacén de polisacáridos poroso, que se prepara según la presente invención, se puede usar con eficacia como materia prima para la fabricación de tejidos u órganos artificiales tales como vasos sanguíneos artificiales, vesícula artificial, esófago artificial, nervios artificiales, corazones artificiales, válvulas cardíacas prostáticas, pieles artificiales, implantes ortopédicos, músculos artificiales, ligamentos artificiales, órganos respiratorios artificiales, etc. Además, el almacén de polisacáridos poroso de la presente invención se puede preparar en la forma de un tejido híbrido por mezcla o incorporación sobre o en otros tipos de biomateriales y con células funcionales procedentes de tejidos u órganos. Puede presentar diversas aplicaciones biomédicas, por ejemplo, para mantener funciones celulares, regeneración de tejidos, etc.

Alternativamente, los almacenes de la invención se pueden usar para suministro celular. En realidad, los almacenes de la invención se pueden usar como una materia prima para preparar sistemas de suministro celular que se pueden administrar a un individuo para fines terapéuticos o de diagnóstico. En una realización particular, los almacenes de la invención se pueden usar para preparar un parche, una biopelícula o un apósito que se pueden cargar con células. Por ejemplo, los almacenes de la invención se pueden usar para preparar un apósito que se puede aplicar sobre la piel, para reconstrucción o curación de la piel. Alternativamente, dicho apósito se puede usar para aplicarse al corazón de un individuo para tratar isquemia (infarto agudo de miocardio). En esas realizaciones, las células que están atrapadas en el almacén pueden migrar así al tejido u órgano objetivo.

En otra realización, los almacenes de la invención se pueden usar para cultivar células. Las células se pueden estimular después para experimentar crecimiento de diferenciación u otros procesos fisiológicos por la adición de factores de crecimiento apropiados. El medio de cultivo que contiene una o más citocinas, factores de crecimiento, hormonas o una combinación de los mismos, se puede usar para mantener las células en un estado no diferenciado o para diferenciar las células en una ruta particular.

Más en particular, el almacén de la invención se puede usar para producir moléculas de interés. En realidad, los almacenes de la invención se pueden usar para proporcionar un entorno biológico para el anclaje de células en un biorreactor, a fin de que las células puedan producir las moléculas deseadas. Los almacenes de la invención proporcionan protección mecánica y biomecánica de las células cultivadas.

Los almacenes pueden servir así como depósito de células para producir las moléculas deseadas tales como proteínas, moléculas orgánicas y nucleótidos. Por ejemplo, las proteínas de interés incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento, hormonas, moléculas señal, inhibidores de crecimiento celular y anticuerpos. Los almacenes de la invención son interesantes en particular para producir anticuerpos monoclonales. Los almacenes de la invención pueden ser también adecuados para producir moléculas orgánicas tales como sabores, moléculas terapéuticas, ...

Con este fin, los almacenes de la invención pueden ser cargados con cualquier tipo de células, incluyendo células procariontas y eucariontas. Por ejemplo, los almacenes de la invención se pueden cargar con bacterias, células de levaduras, células de mamíferos, células de insectos, células de plantas, etc. Ejemplos específicos incluyen *E. coli*, *Kluyveromyces* o levaduras *Saccharomyces*, estirpes celulares de mamíferos (por ej., células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos de células de mamíferos primarias o establecidas (por ej., producidas a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Más en particular, la invención considera el uso de estirpes celulares establecidas tales como hibridomas. Alternativamente, las células se pueden lograr por ingeniería genética para expresar una molécula deseada como se describió anteriormente.

El almacén de la invención puede ser cargado con células, cultivado durante un cierto periodo de tiempo después las células se pueden recuperar/extraer/separar del almacén para uso adicional, tal como aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico o análisis celular. La separación de las células del almacén puede implicar el uso de enzimas que podían degradar el almacén, tales como pululanasa y/o el uso de enzimas que pueden desprender las células tales como colagenasa, elastasa, tripsina o disoluciones que desprenden células tales como AEDT.

La invención se ilustrará además a la vista de las siguientes figuras y ejemplos.

#### Figuras:

Figura 1: Un almacén poroso obtenido como en el Ejemplo 1 (Escala: 6 mm).



Figura 2: Un almacén poroso obtenido como en el Ejemplo 1: análisis de Microscopía de Barrido Electrónico del almacén (imagen derecha, escala: 200 micrómetros).

Figura 3: Absorbancia de formazán (570 nm) el día 1 como una función del número inicial de células sembradas sobre almacenes porosos.

5 **Ejemplos:**

Ejemplo 1: Preparación de almacenes a base de polisacáridos:

Se prepararon almacenes a base de polisacáridos usando una mezcla de pululano/dextrano 75:25 (pululano, M 200.000, Hayashibara Inc., Okayama, Japón; dextrano M 500.000, Pharmacia). Una disolución de polisacáridos se preparó disolviendo 9 g de pululano y 3 g de dextrano en 40 ml de agua destilada. Se añadió después carbonato de sodio (8 g) a la disolución de polisacárido y se mantuvo la agitación hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. Se realizó reticulación química de polisacárido usando el agente de reticulación trimetafosfato trisódico STMP (Sigma, St Louis) en condiciones alcalinas. En pocas palabras, se añadió un mililitro de hidróxido de sodio 10 M a 10 g de la disolución de polisacárido, seguido por la adición de un mililitro de agua que contiene 300 mg de STMP. La mezcla se vertió después en placas de petri (Nuncion®, #150288) y se incubó a 50°C durante 15 min. Los hidrogeles resultantes se sumergieron inmediatamente en un vaso de precipitados grande que contenía una disolución de ácido acético al 20%, durante al menos 30 minutos. Los almacenes resultantes se lavaron de manera extensa con disolución salina de tampón de fosfato pH 7,4 después con agua destilada durante al menos 2 días. Después de una etapa de liofilización, se almacenaron almacenes porosos a temperatura ambiente hasta uso. El análisis por Microscopía de Barrido Electrónico confirmó la porosidad de los almacenes (Figura 1 y 2).

20 Ejemplo 2: Tipos de polisacáridos: Se prepararon almacenes porosos como se describe en el ejemplo 1, usando diferentes tipos y relaciones de polisacáridos, al tiempo que se mantiene la cantidad total de polisacárido a un valor constante. Los polisacáridos fueron pululano, dextrano 500, fucoidán LMW (Peso Molecular Bajo, por sus siglas en inglés) y fucoidán HMW (Peso Molecular Alto, por sus siglas en inglés).

Pululano	Dextrano 500	Fucoidán LMW	Fucoidán HMW	Solubilización	Viscosidad
100%				+++	+++
	100%			+/-	+
50%	50%			++	++
75%	25%			++	++
75%		25%		+/-	+++
75%			25%	+	+

25 Se evaluaron visualmente la solubilización (+++ indica una solubilización completa de los polisacáridos) y la viscosidad de la disolución de polisacárido resultante (+++ indica una viscosidad muy alta de la disolución). En todos los casos se obtuvieron almacenes porosos al final del protocolo.

30 Ejemplo 3: Cantidad de porógeno: Se prepararon almacenes porosos como se describe en el ejemplo 1, al tiempo que se variaba la cantidad del agente porógeno. En pocas palabras, se añadieron 2, 4 u 8 g de carbonato de sodio a la disolución de pululano/dextrano.

Agente porógeno	Solubilización	Viscosidad	Porosidad
2 g	++	++	+
4 g	++	++	++
8 g	++	++	++

Se valoraron visualmente la solubilización (++ indica una solubilización completa de los polisacáridos), la viscosidad de la disolución de polisacáridos resultante (+++ indica que una viscosidad muy alta de la disolución) y la porosidad. Para los almacenes preparados con la cantidad más baja de porógeno (2 g), el proceso de efervescencia fue

moderado, cuando se compara con la efervescencia obtenida con 4 g y 8 g de agente porógeno. En todos los casos, se obtuvieron armazones porosos al final del protocolo.

Ejemplo 4: Concentración de reticulador: Se prepararon armazones porosos como se describe en el ejemplo 1, al tiempo que se variaba la cantidad del agente de reticulación de 200 mg a 500 mg.

Agente de reticulación	Solubilización	Viscosidad	Porosidad
200 mg	++	++	++
300 mg	++	++	++
400 mg	++	+++	++
500 mg	++	+++	+

- 5 Se valoraron visualmente la solubilización (+++ indica una solubilización completa de los polisacáridos), la viscosidad de la disolución de polisacáridos resultante (+++ indica que una viscosidad muy alta de la disolución) y la porosidad. En todos los casos, se obtuvieron armazones porosos al final del protocolo.

10 Ejemplo 5: Carga de células en los armazones porosos: Se cultivaron Células Madre Mesenquimatosas de médula ósea humana (hMSC, por sus siglas en inglés) sobre armazones preparados como en el Ejemplo 1. Se usó un sacabocados circular para cortar armazones porosos de forma redonda de 6 mm de diámetro y 1 mm de espesor. El medio de cultivo consistió en DMEM bajo en glucosa (Gibco, Life Technology, Nueva York) con suero fetal bovino al 10% y penicilina/estreptomicina al 1% (Sigma). Después de tripsinización de las células, se llevó a cabo la rehidratación del armazón seco con 20 µl de suspensión de células (10<sup>6</sup> células/armazón). Las muestras se mantuvieron después en 1 ml de medio de cultivo durante hasta 1 semana. Se incubaron armazones porosos no sembrados en medio de cultivo como controles.

15 Se realizó un ensayo metabólico (MTT, bromuro de 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma) para valorar la viabilidad de las células. En pocas palabras, se mezcló una disolución patrón de 5 mg/ml de MTT (Sigma) 1:10 con DMEM. Los armazones se incubaron durante 3 h a 37C con 1 ml de la disolución de reactivo. Después de lavado de los armazones con PBS, se solubilizaron los cristales de formazán en 0,3 ml de Isopropanol/HCl 0,04 M. Se registró la absorbancia a 590 nm con un lector de microplacas (Multiskan, Thermo Electron Corporation, Waltam, MA). La absorbancia el día 1 fue directamente proporcional al número inicial de células sembradas en los armazones (figura 3).

20 Se llevaron a cabo con éxito experimentos similares con otros tipos de células tales como células de músculo liso vascular primarias y células endoteliales de origen animal y humano.

25 Ejemplo 6: Análisis confocal de comportamiento celular dentro de los armazones porosos: Se prepararon armazones fluorescentes como en el ejemplo 1, por adición de una pequeña cantidad (5 mg) de FITC-dextrano a la disolución de polisacáridos. Se sembraron armazones fluorescentes como en el Ejemplo 5, con hMSC marcadas con un marcador fluorescente (PKH26, SIGMA P9691) según las instrucciones del fabricante. La formación de imagen confocal confirmó la estructura porosa del armazón.

30 Ejemplo 7: Viabilidad de las células por ensayo de vivo y muerto: Se usó formación de imagen confocal para evaluar la viabilidad celular con un ensayo vivo/muerto (Calbiochem, San Diego, CA), basado en el uso de dos sondas fluorescentes que miden la permeabilidad de la membrana celular: un tinte fluorescente verde permeable a las células para colorear células vivas (calceína AM) y un tinte fluorescente rojo no permeable a las células (yoduro de propidio) para colorear las células muertas. El día 7, la mayoría de las células eran células vivas, con sólo algunas células muertas encontradas dentro de los armazones.

Ejemplo 8: Influencia del agente porógeno sobre la porosidad del armazón.

35 Se prepararon armazones porosos como se describe en el ejemplo 1, al tiempo que se variaba la cantidad y la naturaleza del agente porógeno. Para análisis confocal de armazones porosos fluorescentes, se añadieron 5 mg de FITC-dextrano a la disolución de polisacáridos. Se adquirieron secciones ópticas usando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), provisto de una lente objetivo 10x Plan-NeoFluar (apertura numérica de 0,3) (Carl Zeiss). Se excitó FITC-dextrano a 488 nm con un laser de argón y se seleccionó su emisión fluorescente por un filtro de paso de banda de 505-530 nm. Se evaluó el tamaño de poro con el programa informático ImageJ®. Se calculó el volumen vacío con un módulo de medición estadístico/volumen del programa informático Amira® y los resultados se expresaron como porcentaje del volumen del armazón.

Polisacáridos	Agente porógeno	Diámetro medio (µm)	Volumen vacío (%)
Pululano (9 g) + dextrano 500 (3 g)	Carbonato de Sodio (8 g)	195	37%
Pululano (9 g) + dextrano 500 (3 g)	Carbonato de Sodio (8 g) + Cloruro de Sodio (2 g)	207	71%
Pululano (9 g) + dextrano 500 (3 g)	Carbonato de Sodio (8 g) + Cloruro de Sodio (8 g)	272	59%

Ejemplo 9: polisacárido cargado de manera positiva.

Se prepararon armazones porosos cargados de manera positiva usando DEAE-Dextrano como el único polisacárido. En pocas palabras, se preparó disolución de DEAE-dextrano disolviendo 1 g de DEAE-dextrano (Fluka referencia 30461) en 1,5 ml de agua destilada. Después se añadió carbonato de sodio (100 mg) a la disolución de polisacárido y se mantuvo la agitación hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. Se llevó a cabo reticulación química de polisacárido usando el agente de reticulación trimetafosfato trisódico STMP (Sigma, St Louis) en condiciones alcalinas. En pocas palabras, se añadieron 150 µl de hidróxido de sodio 10 M a la disolución de polisacárido, seguido por la adición de 150 µl de agua que contenían 45 mg de STMP. Después se vertió la mezcla en placas de petri (Nunclon®, 150288) y se incubó a 50°C durante 15 min. Se sumergieron inmediatamente los hidrogeles resultantes en un vaso de precipitados grande que contenía disolución de ácido acético al 20%, durante al menos 30 minutos. Los armazones resultantes se lavaron de manera extensa con disolución salina de tampón de fosfato pH 7,4 después con agua destilada durante al menos 2 días. Después de una etapa de liofilización, se obtuvieron armazones porosos y se almacenaron a temperatura ambiente hasta uso.

Ejemplo 10: polisacárido cargado de manera negativa

Se prepararon armazones porosos cargados de manera negativa por adición de fucoidán (Sigma referencia F5631) a una mezcla pululano/dextrano. En pocas palabras, se preparó una disolución de polisacárido disolviendo 9 g de pululano y 3 g de dextrano en 40 ml de agua destilada, añadiendo después 1,2 g de fucoidán a la disolución de polisacárido. Después se añadió carbonato de sodio (8 g) a la disolución de polisacárido y se llevó a cabo el proceso de reticulación como se describe en el Ejemplo 1 para obtener un armazón 3D que contenía un polisacárido cargado de manera negativa.

Ejemplo 11: diferenciación de células madre mesenquimatosas humanas en células de tipo condrocitos en armazones 3D

Se cultivaron Células Madre Mesenquimatosas de médula ósea humanas (hMSC) sobre armazones preparados como en el Ejemplo 1 en medio condrogénico sin suero. El medio condrogénico consistió en DMEM enriquecido con 10 ng/ml de TGF-β3 (Oncogene, Cambridge, MA), dexametasona 100 nM (Sigma, St Louis, MO), ácido ascórbico 2-fosfato 170 µM (Sigma, St Louis, MO) y 5 ml de ITS-plus (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA). Después de 3 semanas de cultivo, se fijaron los armazones sembrados en formaldehído al 10%, después se crioseccionaron. Se colorearon secciones congeladas con azul de toluidina al 0,05% (p/v) o con disolución de safranina O al 0,1%. Se observó una coloración positiva para síntesis de matriz extracelular, que indica diferenciación MSC en células de cartílago.

Ejemplo 12: cultivo 3D de hepatocitos

Se cultivaron células HepG2, células de carcinoma hepatocelular humano, en DMEM con poca glucosa (Gibco, Life Technology, Nueva York, USA) con suero fetal bovino al 10% y 1% penicilina/estreptomina (Sigma) sobre los armazones preparados como en el Ejemplo 1. Se usó un sacabocados circular para cortar armazones porosos de forma redonda de 6 mm de diámetro y 1 mm de espesor.

Después de tripsinización de las células, se llevó a cabo rehidratación del armazón seco con 20 µl de suspensión de células (85.000 células/armazón). Después se mantuvieron las muestras en 1 ml de medio de cultivo durante hasta 1 semana. Se usaron como controles armazones porosos no sembrados en medio de cultivo. Se observó formación

## ES 2 408 554 T3

de esferoides de hepatocitos usando Calceína AM (Calbiochem, San Diego CA, USA) que es un tinte polianiónico hidrolizado por células vivas produciendo así una fluorescencia verde uniforme intensa (longitud de onda 485-535 nm), según las instrucciones del fabricante. Los armazones sembrados contenían hepatocitos vivos adecuados para ensayos fármaco-toxicológicos.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar un armazón poroso que comprende las etapas que consisten en:
  - a) preparar una disolución acuosa alcalina que comprende una cantidad de al menos un polisacárido, una cantidad de un agente de reticulación covalente y una cantidad de un agente porógeno,
  - 5 b) transformar la disolución en un hidrogel poniendo dicha disolución a una temperatura de 4°C a 80°C durante un tiempo suficiente para permitir la reticulación de dicha cantidad de polisacárido,
  - c) sumergir dicho hidrogel en una disolución acuosa,
  - d) lavar el armazón poroso obtenido en la etapa c).
2. El método según la reivindicación 1, en el que dicho polisacárido es seleccionado del grupo que consiste en:
 10 dextrano, agar, ácido algínico, ácido hialurónico, pululano, inulina, heparina, fucoidán, quitosán y mezclas de los mismos.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho agente de reticulación covalente es seleccionado del grupo que consiste en: trimetafosfato trisódico (STMP), oxiclورو de fósforo (POCl<sub>3</sub>), epíclorohidrina, formaldehídos, carbodiimidias hidrosolubles y glutaraldehídos.
- 15 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho agente de reticulación covalente es trimetafosfato trisódico (STMP).
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el agente porógeno es seleccionado del grupo que consiste en: carbonato de amonio, bicarbonato de amonio, carbonato de calcio, carbonato de sodio y bicarbonato de sodio y mezclas de los mismos y el líquido de la etapa b) es una disolución ácida.
- 20 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la relación en peso del polisacárido al agente porógeno está en el intervalo de 6:1 a 1:1.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la relación en peso del polisacárido al agente de reticulación está en el intervalo de 15:1 a 1:1.
8. Un armazón poroso obtenible por el método según la reivindicación 4.
- 25 9. El armazón poroso según la reivindicación 8, en el que el tamaño de los poros está comprendido entre 1 μm y 500 μm.
10. El armazón poroso según la reivindicación 8 ó 9, en el que la porosidad está en el intervalo de 4% a 50%.
11. El armazón poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, cargado con una cantidad de células, seleccionadas preferiblemente del grupo que consiste en: células de levaduras, células de mamífero, células de
 30 insecto y células de plantas.
12. El armazón 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; sinoviocitos; células de médula ósea; células epiteliales, hepatocitos, células mesenquimales; células estromales; células musculares; células madre; células madre embriónicas; células precursoras procedentes de tejido adiposo; células progenitoras de sangre periférica; células madre aisladas de tejido adulto y células transformadas de manera genética.
- 35 13. El armazón poroso según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para ingeniería de tejidos, cultivo celular y suministro celular.
14. Un sustituto vascular fabricado con un armazón como se define según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
- 40 15. Cartílago o implantes óseos fabricados con un armazón como se define según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.
16. Uso de un armazón como se define según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para la evaluación de la toxicidad y/o farmacología de un producto.
- 45 17. Un sistema de liberación controlada de un agente activo fabricado con un armazón como se define según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11.

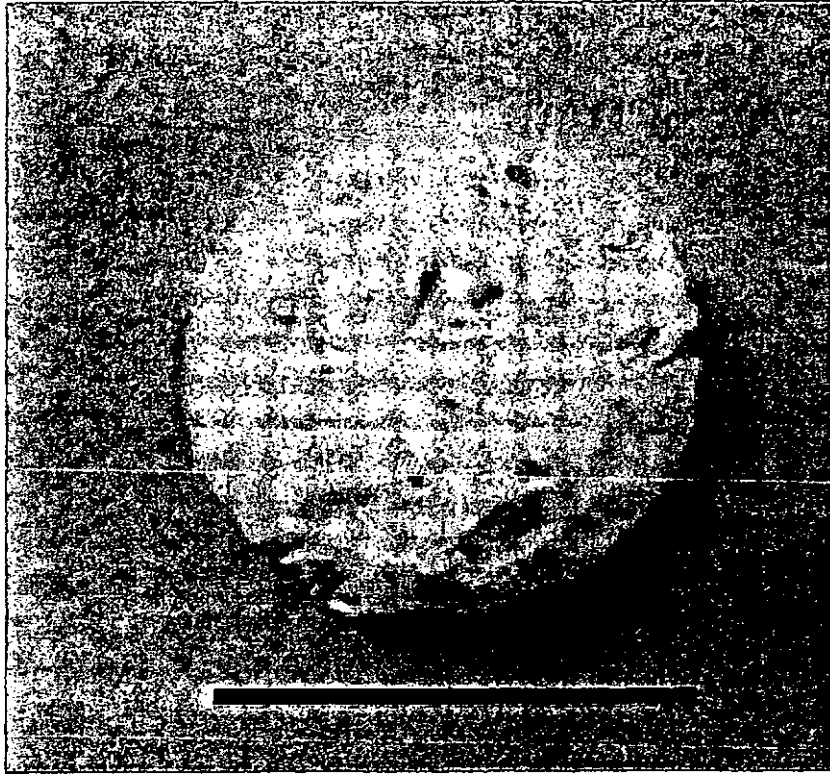
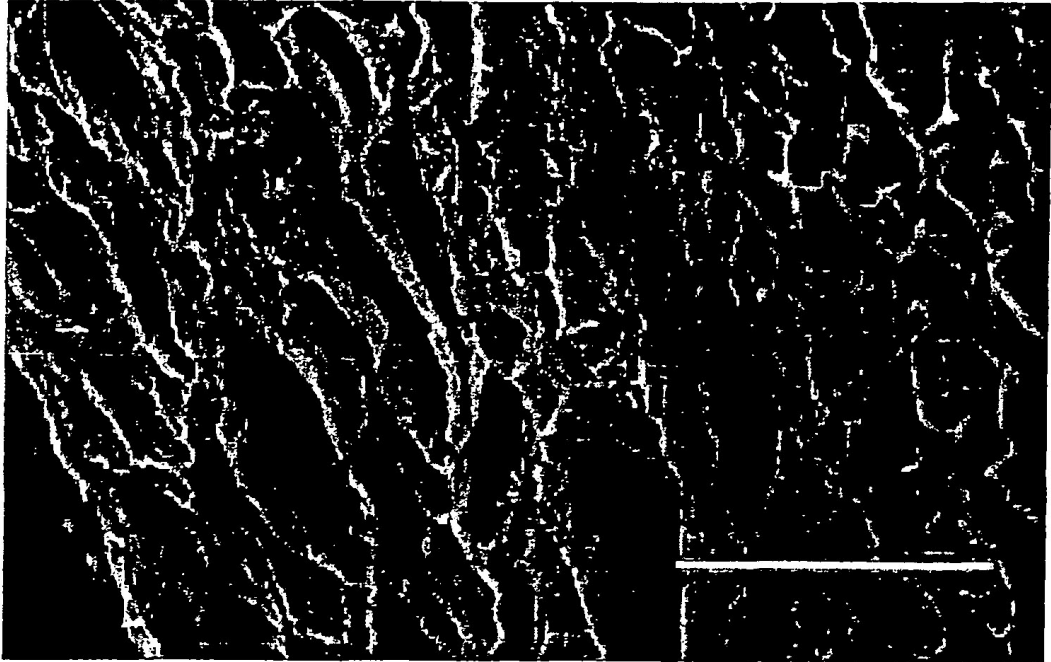


Figura 1



**Figura 2**

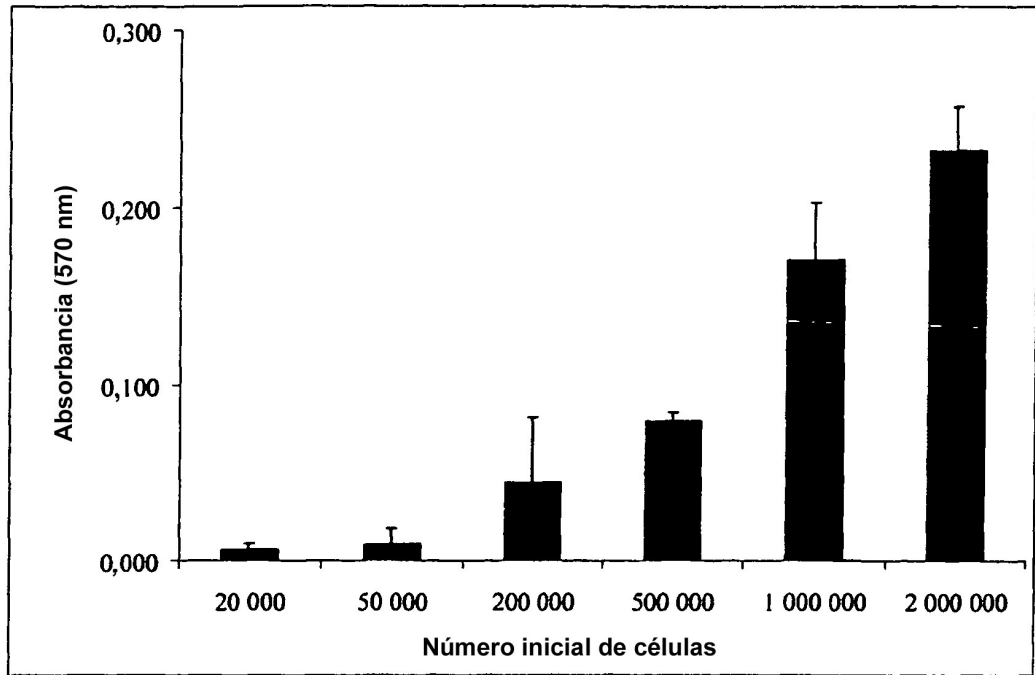


Figura 3