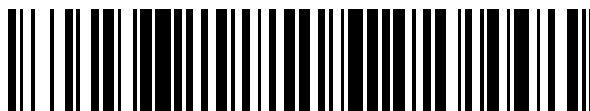


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 285**

51 Int. Cl.:

A61F 2/00	(2006.01)	A61L 27/56	(2006.01)
C12P 19/34	(2006.01)		
C12N 11/16	(2006.01)		
C12N 11/02	(2006.01)		
C12N 11/08	(2006.01)		
C12N 11/04	(2006.01)		
C12N 5/07	(2010.01)		
C12N 5/22	(2006.01)		
A61L 27/24	(2006.01)		
A61L 27/38	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2002 E 02753826 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2013 EP 1370194**

54 Título: **Composición y procedimientos para la producción de tejidos biológicos y construcciones tisulares**

30 Prioridad:

23.03.2001 US 278534 P
24.01.2002 US 352085 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2013

73 Titular/es:

HISTOGENICS CORPORATION (50.0%)
830 WINTER STREET, 3RD FLOOR
WALTHAM, MA 02451, US y
TAKAGI INDUSTRIAL CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

TARRANT, LAURENCE J.;
MIZUNO, SHUICHI y
TOKUNO, TOSHIMASA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 414 285 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

Composición y procedimientos para la producción de tejidos biológicos y construcciones tisulares

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para preparar tejidos y construcciones tisulares. En particular, la invención enumera procedimientos que incorporan células en matrices biológicas.

Antecedentes

10 Los tejidos y órganos de vertebrados con frecuencia no consiguen recuperar la forma y la función normales cuando se dañan y con frecuencia no consiguen (debido a traumatismo metabólico y/o mecánico) integrarse adecuadamente con un huésped cuando se trasplantan. En un intento de reconstruir tejidos y órganos, los cirujanos han implantado tejidos vivos o materiales no vivos en lugar de estructuras anatómicas nativas dañadas o reseca-
das. Estas técnicas tradicionales tienen limitaciones. Por ejemplo aunque los autoinjertos son histocompatibles, la pérdida de tejido del sitio donador con frecuencia crea patologías anatómicas y/o fisiológicas en el mismo huésped. Por otro lado, los aloinjertos y xenoinjertos trasplantados con frecuencia provocan una respuesta inmune patológica que se aproxima al rechazo de estos injertos por el huésped.

15 Los materiales de trasplante no vivos tienen una utilidad marginal en la reparación y trasplante de tejidos nativos, construcciones tisulares y órganos. Específicamente, los materiales no vivos trasplantados están especialmente sujetos a extrusión, infección y formación de tejido cicatrizante.

20 También se ha descrito el uso de tejido modificado por biotecnología como alternativa a tejidos nativos trasplantados y materiales no vivos. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.902.741 de Purchio y col. enseña un procedimiento para cultivar tejido cartilaginoso *in vitro* usando un armazón inoculado con un medio nutriente que porta células cartilaginosas o precursores. De forma similar la Patente de Estados Unidos Nº 5.928.945 de Selektar y col. enseña un procedimiento para producir neo-cartílago obtenido por ingeniería biológica aplicando tensión de flujo de cizallamiento de flujo de fluido a condrocitos. En otro ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.080.194 de Pachence y col. enseña un molde para producir cartílago articular que comprende una matriz de colágeno densa
25 situada en la superficie del defecto de cartílago para evitar la migración celular y crecimiento interno vascular a partir de la placa sub-condral.

30 SMITH R L y col.: "In vitro stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure" JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH, JOHN WILEY & SONS, INC, NEEDHAM, MA, vol. 14, Nº 1, 1 de enero de 1996 (01-01-1996), páginas 53-60, ISSN: 0736-0266, desvela un procedimiento que comprende: a- proporcionar una solución que comprende condrocitos; b- sembrar los condrocitos en un dispositivo para obtener una monocapa de alta densidad en un dispositivo sembrado; c- tratar dicho dispositivo sembrado en condiciones que comprenden someter a dicho dispositivo sembrado con condrocitos a cultivo con una presión hidrostática cíclica de 10 MPa a 1 Hz durante 4 horas. La presión hidrostática cíclica simula la presión hidrostática fisiológica y activa los condrocitos.

35 Sin embargo, estas composiciones y procedimientos (en la técnica anterior) sólo se aproximan a una fracción del repertorio anatómico y fisiológico del tejido nativo que intentan remplazar. Más específicamente, estos defectos en la técnica anterior pueden, en parte, atribuirse a la incapacidad para sembrar de forma uniforme, cultivar y diferenciar células a través de la sección transversal completa de una capa de soporte celular tridimensional. Lo que se necesita, por lo tanto son tejido trasplantable y construcciones tisulares que pueden soportar células en su estado
40 metabólico normal y pueden integrarse anatómicamente y fisiológicamente con un huésped sin provocar una patología.

Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere a procedimientos para la preparación de tejidos y construcciones tisulares. En particular, la invención se refiere a la construcción de una estructura biológica en múltiples capas (es decir armazón de sistema) que comprende células vivas incorporadas en una matriz de soporte celular. El procedimiento de la invención se define en la reivindicación 1. La presente invención contempla una composición que comprende una primera capa de integración; una segunda capa de soporte celular (que comprende una matriz de esponja) unida operativamente a dicha primera capa de integración en la que dicha capa de soporte está sembrada con células (suspendidas en un gel), y una tercera capa protectora unida operativamente a dicha primera y segunda capas.

50 No se pretende que el procedimiento de la presente invención se limite a proporcionar una composición que comprenda un sistema de múltiples capas que tenga un número específico de capas. En una realización, dicho sistema de múltiples capas comprende dos capas. En una realización preferida, dicho sistema de múltiples capas comprende tres capas. En otra realización, dicho sistema de múltiples capas comprende más de tres capas.

55 No se pretende que el elemento de gel de dicha capa de soporte celular se limite a una composición única. En una realización, dicho elemento de gel comprende gelatina. En otra realización, dicho elemento de gel comprende

colágeno. En una realización preferida, dicho elemento de gel comprende colágeno de Tipo I.

No se pretende que los procedimientos de la presente invención se limiten a células recogidas de ninguna especie particular. En una realización, dichas células son células de mamífero. En una realización preferida, dichas células son de un ser humano. Las células usadas en los procedimientos de la presente invención son condrocitos recogidos de tejido conectivo. En una realización preferida, dicho tejido conectivo es cartílago.

En una realización, la presente invención describe procedimientos para preparar tejidos o construcciones tisulares usando un sistema de múltiples capas que incluye una matriz de soporte celular sembrada con células vivas directamente aisladas y/o expandidas a partir de tejido viable. En una realización preferida, la presente invención contempla un procedimiento que proporciona una matriz de soporte celular, un gel y células; mezclar dichas células con dicho gel para formar una suspensión celular; y poner en contacto dicha suspensión celular con dicha matriz de soporte celular para crear una matriz sembrada de células.

En otra realización, la presente invención comprende además aplicar calor a dicha matriz sembrada con células en condiciones en las que dicho gel se cura a una forma sustancialmente sólida, formando de este modo una matriz sembrada con células curada con calor.

La presente invención comprende además cultivar dicha matriz sembrada con células curada por calor en condiciones que comprenden presión hidrostática cíclica, pudiendo dicha matriz de soporte celular consistir esencialmente en colágeno de tipo I poroso y siendo dichas células condrocitos.

En una realización, la presente invención describe un procedimiento, que comprende:

- a) proporcionar, i) una solución que comprende condrocitos suspendidos; ii) una matriz de esponja; y iii) un medio de tratamiento; b) introducir dicha matriz de esponja en dicha solución en condiciones tales que dicha solución entre en dicha esponja por acción capilar y dichos condrocitos entren en contacto con dicha matriz para crear un dispositivo sembrado; y c) tratar dicho dispositivo sembrado con dicho medio de tratamiento en condiciones tales que al menos una parte de dicha solución solidifique dentro de dicho dispositivo.

En una realización de la presente invención, dicho medio de tratamiento comprende una cámara de cultivo. En otra realización, la presente invención contempla un tratamiento, de dicho dispositivo sembrado, que comprende calentar en ausencia de dióxido de carbono.

En una realización de la presente invención, la matriz de esponja se configura para trasplantarse a una articulación de un ser humano.

En una realización de la presente invención, la solución de suspensión de condrocitos comprende colágeno de tipo I acuoso neutralizado.

En otra realización la presente invención comprende además, después de la etapa (c) anterior, cultivar dichos condrocitos en condiciones tales que dichos condrocitos elaboren productos génicos asociados con la matriz extracelular. En una realización, dicho cultivo se realiza bajo presión hidrostática constante o cíclica estando dicha presión hidrostática cíclica en un intervalo de aproximadamente 0,01 - 10,0 MPa a 0,5 Hz. En otra realización, dicha presión hidrostática cíclica está en un intervalo de 0,5 - 5,0 MPa a 0,5 Hz. En una realización preferida, dicha presión hidrostática cíclica es aproximadamente 3,0 MPa de presión a 0,5 Hz. En una realización la duración de dicha presión cíclica es 1 - 30 días. En otra realización, la duración de dicha presión cíclica es 5 - 8 días. En una realización preferida, la duración de dicha presión cíclica es de aproximadamente 6 días.

En una realización la presente invención contempla una fase de reposo (después de exposición a presión cíclica). En una realización, la duración de dicha fase de reposo está en el intervalo de 1 - 60 días. En una realización, la duración de dicha fase de reposo está en el intervalo de 4 - 21 días. En una realización preferida, dicha fase de reposo es de aproximadamente 12 días.

En otra realización la presente invención describe un procedimiento, que comprende:

- a) proporcionar i) una solución que comprende condrocitos suspendidos en colágeno acuoso; ii) una matriz de soporte celular; y iii) un medio de tratamiento; b) introducir dicha matriz en dicha solución en condiciones tales que dicha solución entre en dicha esponja por acción capilar y dichos condrocitos entren en contacto con dicha matriz para crear un dispositivo sembrado; y c) hacer reaccionar dicho dispositivo sembrado con dicho medio de tratamiento en condiciones tales que al menos una parte de dicha solución solidifique dentro de dicho dispositivo.

En una realización de la presente invención, dicha solución de suspensión de condrocitos está al menos parcialmente gelificada.

En una realización de la presente invención, el medio de tratamiento comprende una cámara de cultivo. En otra realización el tratamiento comprende calentar en ausencia de dióxido de carbono.

En una realización de la presente invención, la matriz de esponja comprende colágeno de tipo I configurado para trasplantarse a una articulación de un ser humano.

En otra realización, la presente invención comprende además, después de la etapa (c), cultivar dichos condrocitos en condiciones tales que dichos condrocitos elaboren productos génicos asociados con la matriz extracelular.

- 5 En una realización de la presente invención, dicho cultivo se realiza bajo presión hidrostática cíclica estando dicha presión hidrostática cíclica en un intervalo de aproximadamente 0,01 - 10,0 MPa a 0,5 Hz. En otra realización, dicha presión hidrostática cíclica está en un intervalo de 0,5 - 5,0 MPa a 0,5 Hz. En una realización preferida, dicha presión hidrostática cíclica es aproximadamente 3,0 MPa de presión a 0,5 Hz. En una realización la duración de dicha presión cíclica es 1 - 30 días. En otra realización, la duración de dicha presión cíclica es de 5 - 8 días. En una
10 realización preferida, la duración de dicha presión cíclica es de aproximadamente 6 días.

La presente invención contempla una fase de reposo (después de exposición a presión cíclica), estando la duración de dicha fase de reposo en el intervalo de 1 - 60 días. En otra realización, la duración de dicha fase de reposo está en el intervalo de 4 - 21 días. En una realización preferida, dicha fase de reposo es de aproximadamente 12 días.

- 15 No se pretende que la presente invención se limite a una situación en la que dichos condrocitos estén suspendidos en una solución de sol-gel. No se pretende que la presente invención se limite a ningún grado específico de gelificación para dicha solución de sol-gel que contiene condrocitos.

- 20 No se pretende que la presente invención se limite a una situación en la que la solución de suspensión de condrocitos completa se solidifique. Es decir, es suficiente que una parte significativa de la solución se solidifique, inmovilizando sustancialmente de este modo en una realización las células suspendidas dentro de una matriz sembrada.

- 25 En una realización, la presente invención contempla un sistema, que comprende: i) una capa de soporte celular configurada para permitir el crecimiento de células en tres dimensiones, teniendo dicha capa de soporte celular un lado de integración y un lado funcional, y en la que dicho soporte celular se siembra con al menos un tipo celular para crear células sembradas; ii) una capa de integración que está en contacto con dicho lado de integración de dicha capa de soporte celular, configurándose dicha capa de integración para poder insertarse en el tejido; y iii) una capa protectora que está en contacto con dicho lado funcional de dicha capa de soporte celular, configurándose dicha capa protectora para proteger dichas células sembradas de los efectos de agentes transportados por la sangre.

- 30 En una realización de la presente invención, dichos agentes transportados por la sangre son factores de coagulación, citocinas y/o células citotóxicas. En una realización de la presente invención, dichas células sembradas están en contacto con un fluido nutriente. En otra realización de la presente invención, dicha capa de integración se configura para poder insertarse en tejido después de cirugía.

- 35 La presente invención puede usarse en un procedimiento para insertar un sistema que comprende: i) una capa de soporte celular configurada para permitir el crecimiento de células en tres dimensiones, teniendo dicha capa de soporte celular un lado de integración y un lado funcional, y en la que dicho soporte celular se siembra con al menos un tipo celular para crear células sembradas; ii) una capa de integración que está en contacto con dicho lado de integración de dicha capa de soporte celular, configurándose dicha capa de integración para poder insertarse en tejido; y iii) una capa protectora que está en contacto con dicho lado funcional de dicha capa de soporte celular, configurándose dicha capa protectora para proteger dichas células sembradas de los efectos de agentes transportados por la sangre y en los tejidos de un paciente. La inserción del sistema en el paciente es después de la
40 cirugía en dicho paciente.

Descripción de los dibujos

- 45 La Figura 1 proyecta datos sobre el efecto de la presión hidrostática cíclica, en comparación con presión atmosférica estática, en producción de glicosaminoglicano (GAG) por condrocitos cultivados dentro de la matriz de TESS. Específicamente, esta figura muestra que hay un aumento del 300 % ($p < 0,001$) en la producción de GAG en matrices de TESS en el grupo de ensayo (3,0 MPa de CHP a 0,5 Hz) con respecto a las matrices de TESS en el grupo de control (solamente presión atmosférica).

- 50 La Figura 2A es una microfotografía que presenta la elaboración de tinción de Safranina-O de la matriz extracelular por condrocitos, cultivados bajo presión atmosférica estática (grupo de control) dentro de la matriz de TESS. En esta figura el elemento de esponja en panel de la matriz de soporte celular (por ejemplo la matriz de TESS) se marca con "HC" y un área de la matriz extracelular (elaborada por los condrocitos cultivados) está marcada con un "*".

- 55 La Figura 2B es una microfotografía que presenta la elaboración de tinción con Safranina-O de la matriz extracelular por condrocitos, cultivados bajo presión hidrostática cíclica (grupo de ensayo) dentro de la matriz de TESS. En esta figura el elemento de esponja en panel de la matriz de soporte celular (por ejemplo la matriz de TESS) está marcado con "HC" y un área de matriz extracelular (elaborada por los condrocitos cultivados) está marcada con un "*".

La Figura 3A es otra microfotografía que presenta la elaboración de tinción con Safranina-O de matriz

extracelular por condrocitos, cultivados bajo presión atmosférica estática (grupo de control), dentro de la matriz de TESS. En esta figura el elemento de esponja en panal de la matriz de soporte celular (por ejemplo la matriz de TESS) está marcado con "HC" y un área de matriz extracelular (elaborada por los condrocitos cultivados) está marcada con un "**".

5 La Figura 3B es otra microfotografía que presenta la elaboración de tinción con Safranina-O de la matriz extracelular por condrocitos, cultivados bajo presión hidrostática cíclica (grupo de ensayo), dentro de la matriz de TESS. En esta figura el elemento de esponja en panal de la matriz de soporte celular (por ejemplo la matriz de TESS) está marcado con "HC" y un área de matriz extracelular (elaborada por los condrocitos cultivados) está marcada con un "**".

10 La Figura 4 ilustra datos sobre el efecto de la presión hidrostática cíclica, en comparación con presión atmosférica estática, en la producción de glicosaminoglicanos (GAG) por condrocitos cultivados con la matriz de TESS. Específicamente, esta figura muestra que hay un aumento del 132 % ($p < 0,006$) en la producción de GAG en matrices de TESS en el grupo de ensayo (3,0 MPa de CHP a 0,5 Hz) en comparación con matrices de TESS en el grupo de control (presión atmosférica solamente).

15 **Definiciones**

Como se usa en el presente documento, el término "tejido" se refiere a una colección de células similares y las sustancias intercelulares que los rodean. Apreciarán los expertos en la materia que hay cuatro tipos tisulares básicos en el cuerpo, 1) epitelio; 2) tejido conectivo incluyendo sangre, hueso y cartílago; 3) músculo; y 4) nervio.

20 Como se usa en el presente documento, el término "neo-tejido" se refiere a una composición, que comprende células, que se aproxima a la forma y función de un tejido nativo *in situ*.

Como se usa en el presente documento, el término "neo-órgano" se refiere a una composición sintética, que comprende células, que se aproxima a la forma y función de un órgano nativo *in situ*.

25 Como se usa en el presente documento, el término "neo-cartílago" se refiere a una pluralidad de condrocitos en un estadio transicional de histogénesis. Este estado transicional de histogénesis se caracteriza por la elaboración de productos génicos asociados con la matriz extracelular (es decir GAG) y una morfología que comprende encapsulación parcial en lagunas. En una realización, este neo-cartílago se fabrica por Histogenics Corporation (Easthampton, MA) con la marca comercial NEOCART.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción tisular" se refiere a una población de células mixtas sustancialmente avascular que (en una realización preferida) se propaga en un sistema de cultivo tisular incluyendo, pero sin limitación, el procesador tisular de TESS.

La expresión "construcción de neo-tejido" se refiere a construcciones tisulares formadas *de novo* a partir de células o tejido por los procedimientos de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ambiente nativo" se refiere al ambiente biológico *in situ* que soporta un tejido nativo o una construcción tisular.

35 Como se usa en el presente documento, el término "biocompatible" se refiere a composiciones (por ejemplo células, tejidos, matrices, etc.) que no interrumpen sustancialmente las funciones biológicas normales de otras composiciones con las que entran en contacto. Por ejemplo, la presente invención contempla una composición que comprende un sistema de múltiples capas que tiene una estructura física y química que es biocompatible con las células y tejido producido por dicho sistema (por ejemplo neo-tejidos), y que también es biocompatible con las células o tejidos en los que se suministra dicho sistema (y sus células o tejido). En realizaciones seleccionadas, la presente invención también contempla materiales biocompatibles que son tanto biodegradables como no biodegradables.

45 Como se usa en el presente documento, el término "matriz" se refiere a una composición que comprende una pluralidad de poros que dividen el espacio libre en intersticios parcialmente cerrados en los que dichos intersticios están en comunicación fluida. Un tipo de matriz es una "matriz de esponja" que comprende una matriz que capta fluido por acción capilar. En realizaciones seleccionadas, la presente invención contempla una composición que comprende una capa de soporte celular, en la que dicha capa de soporte celular comprende una matriz de esponja de colágeno.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "matriz de TESS" se refiere a una realización comercial (una composición patentada fabricada por Koken Company LTD., Tokio, Japón) de la capa de soporte celular descrita en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, la expresión "tamaño de poro" se refiere a la dimensión en sección transversal media de los intersticios en una matriz.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "superficie funcional" se refiere a la superficie dirigida hacia una región de una célula, tejido u órgano que lleva a cabo al menos una función. Por ejemplo, en un sistema para

producir cartílago, la expresión “superficie funcional” se refiere a la superficie dirigida hacia el sinovio cuando el sistema se implanta en un huésped. De forma similar, en un sistema para producir mucosa oral, la expresión “superficie funcional” se refiere a la superficie dirigida hacia el interior de la boca una vez que el sistema se ha implantado en un huésped.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término “donante” se refiere a un ser humano o no humano del que se toman células, tejidos, sangre o un órgano para trasplante.

Como se usa en el presente documento, un “huésped” se refiere a un individuo (bien humano o bien no humano) en el que se trasplantan células, tejido, sangre u órganos. Por ejemplo, la presente invención contempla procedimientos en los que se toman células (por ejemplo condrocitos) de un donante para multiplicación *in vitro* y trasplante en un huésped (si el donador y el huésped son el mismo individuo o son individuos diferentes).

10 Como se usa en el presente documento, la palabra “condrocito” se refiere a un tipo específico de célula cartilaginosa. *In vivo*, estas células se caracterizan por morfologías y fisiologías definidas (observadas *in situ*) en comparación con las morfologías y fisiologías *in vitro* (observadas en cultivo tisular) para estas mismas células. Por ejemplo, los condrocitos recogidos de tróclea de mamífero adulto sustancialmente no se dividen y no elaboran sustancialmente ninguna matriz extracelular (es decir GAG). Por el contrario los condrocitos sustancialmente quiescentes aislados de tróclea de mamíferos adultos se activan *in vitro* (por ejemplo cuando se sitúan en cultivo tisular) de modo que una mayoría de estas células cultivadas se dividen y producen, *in vitro*, productos génicos asociados con la matriz extracelular (es decir GAG).

20 Como se usa en el presente documento, la expresión “condrocitos suspendidos” se refiere a cualquier número de condrocitos en un fluido. En una realización preferida dicho fluido comprende colágeno de tipo I acuoso.

Como se usa en el presente documento, la expresión “suministrar tejido” se refiere al procedimiento de introducir, insertar, inyectar o trasplantar células o tejido de un donante a un huésped. Por ejemplo, la presente invención contempla procedimientos en los que se suministra tejido que ha crecido en el sistema de múltiples capas de la presente invención (es decir neo-tejido) en un huésped en, por ejemplo, el sitio de una lesión (es decir lesión diana).

25 Como se usa en el presente documento, la expresión “presión hidrostática cíclica” (y la abreviatura “CHP”) se refiere a la aplicación de periodos repetidos (por ejemplo dos o más) de presión hidrostática aplicada (dentro de un intervalo de carga definido) que preferentemente crea una forma de onda sinusoidal de presión medida. En una realización preferida dicha CHP es 3,0 MPa a 0,5 Hz.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión “presión constante” se refiere a la aplicación de una carga de presión sustancialmente no fluctuante (por ejemplo más o menos un 20 % o menos, o más preferentemente un 5 % o menos) o presión no cíclica durante un periodo de tiempo.

Como se usa en el presente documento, el término “carga” o “intervalo de carga” se refiere a un periodo de carga de CHP aplicada seguido de un retorno a presión ambiental (por ejemplo en la que no se aplica presión externa).

35 Como se usa en el presente documento, la expresión “fase de reposo” se refiere a un periodo de tiempo variable en el que las células se mantienen en cultivo a aproximadamente presión atmosférica después de exposición a un cultivo bajo presión hidrostática cíclica.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión “formación *de novo*” se refiere a la producción de células (por ejemplo, condrocitos, fibroblastos, fibrocondrocitos, tenocitos y osteoblastos) o tejidos (por ejemplo tejido conectivo cartilaginoso, fibrocartilago, tendón y hueso) dentro de una estructura de soporte (por ejemplo sistema de múltiples capas, armazón o matriz de colágeno).

45 Como se usa en el presente documento, la expresión “Colágeno de tipo I” se caracteriza por dos cadenas alfa 1 (I) y una cadena alfa 2 (I) (colágeno heterotrimérico). Las cadenas alfa 1 (I) son aproximadamente de 300 nm de longitud. El colágeno de tipo I se encuentra predominantemente en hueso, piel (en estructuras de tipo lámina) y tendón (en estructuras de tipo cuerda). El colágeno de tipo I se tipifica adicionalmente por su reacción con el núcleo proteico de otro componente de tejido conectivo conocido como proteoglicano.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión “colágeno de tipo II” se caracteriza por tres cadenas idénticas alfa 1 (II) (colágeno homotrimérico) presentes en el cromosoma 12. El colágeno de tipo II en cartílago se presenta como fibrillas delgadas en una malla suelta, que interacciona fuertemente con otros componentes (especialmente proteoglicanos). El colágeno de tipo II está reticulado de forma covalente con colágeno de tipo IX y otros colágenos FACIT, que ayudan en la formación de colágeno de tipo II. Esta molécula también es capaz de unirse e interaccionar con moléculas de integrina y decorina.

Como se usa en el presente documento, “colágeno de tipo I acuoso neutralizado” se refiere a colágeno de tipo I sin carga.

Como se usa en el presente documento, “MMP” se refiere a “metaloproteinasa de matriz”. MMP se asocia con degeneración de cartílagos en una articulación enferma. MMP puede distinguirse adicionalmente como MMP-1, MMP-2, MMP-9, etc.

Como se usa en el presente documento, el término “MPa” significa MegaPascal. Un MPa es igual a 145 psi.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término “mandril” se refiere a un eje, huso o varilla ahusado o cilíndrico que actúa como un núcleo alrededor del cual el material puede moldearse por vaciado, forjarse, torsionarse o modelarse de otro modo.

- 10 Como se usa en el presente documento, la expresión “tejido epitelial” se refiere a la capa celular (normalmente avascular) que abarca las superficies libres, cutáneas, mucosas y serosas, incluyendo las glándulas y otras estructuras derivadas de las mismas. El tejido epitelial presenta células escamosas, cúbicas y/o columnares tras su examen histológico. Además, el tejido epitelial puede describirse como simple, estratificado o pseudoestratificado.

- 15 Como se usa en el presente documento, la expresión “tejido conectivo” se refiere a tejido que protege y soporta el cuerpo y sus órganos, y tejidos que unen órganos entre sí. Los ejemplos de tales tejidos incluyen (pero sin limitación) mesénquima, tejido conectivo mucoso, areolar (suelto), adiposo, reticular, elástico, colagenoso, óseo, sangre o cartilaginoso (por ejemplo, cartílago hialino, fibroso y elástico).

Como se usa en el presente documento, la expresión “tejido muscular” se refiere a tejido que se caracteriza por la capacidad para contraerse tras estimulación y puede categorizarse como esquelético, cardíaco y liso.

Como se usa en el presente documento, la expresión “tejido nervioso” se refiere a tejido (que comprende fibras nerviosas, dendritas y tejidos de soporte) que inicia y transmite impulsos nerviosos.

- 20 Como se usa en el presente documento, las expresiones “tejido de membrana” y “tejido membranoso” se refiere a una combinación de tejido epitelial y tejido conectivo que forma una membrana. Los ejemplos de tales membranas incluyen (pero sin limitación) membranas mucosas, serosas, cutáneas y sinoviales.

- 25 Como se usa en el presente documento, la expresión “solución de sol-gel” se refiere a una suspensión coloidal que puede cambiar de un líquido (sol) a un material más sólido (gel). En una realización preferida, el “sol” es una suspensión de colágeno acuoso que cambia, por tratamiento con calor, a un gel.

Como se usa en el presente documento, el término “gel” o “gelificado” se refiere al estado de la materia entre líquido y sólido. Como tal, un “gel” tiene algunas de las propiedades de un líquido (es decir, la forma es elástica y deformable) y algunas de las propiedades de un sólido (es decir, la forma es suficientemente discreta para mantener tres dimensiones en una superficie bidimensional).

- 30 Como se usa en el presente documento, la expresión “parcialmente gelificado” se refiere al estado de la materia entre líquido y sólido de modo que una sustancia demuestre más de las propiedades de un líquido (es decir, la forma es elástica y deformable) y menos de las propiedades de un sólido (es decir, la forma es suficientemente discreta para mantener tres dimensiones en una superficie bidimensional).

- 35 Como se usa en el presente documento, el término “solidifica” o “solidificado” se refiere a cualquier procedimiento por el que una sustancia se haga sólida, compacta o dura.

Como se usa en el presente documento, la expresión “solidifica parcialmente” o “solidificado parcialmente” se refiere a cualquier procedimiento por el que una sustancia se haga en algún grado más sólida compacta o dura en comparación con la sustancia sobre la que se actúa.

- 40 Como se usa en el presente documento, las palabras “curar” o “curado” se refiere a la aplicación de un procedimiento químico o físico para solidificar adicionalmente un gel.

Como se usa en el presente documento, la expresión “medio de tratamiento” se refiere a cualquier dispositivo que pueda regular la temperatura, presión atmosférica y/o saturación de gas.

- 45 Como se usa en el presente documento, la expresión “dispositivo sembrado” se refiere a una matriz que contiene cualquier número de células. En una realización preferida, dicho dispositivo sembrado comprende condrocitos dispuestos dentro de una matriz de esponja de colágeno.

Como se usa en el presente documento, la expresión “elaborar productos génicos” se refiere a la producción de péptidos y/o proteínas por una célula. En una realización preferida, los condrocitos producen proteínas asociadas con la matriz extracelular de cartílago (incluyendo pero sin limitación GAG).

Descripción detallada de la invención

La presente invención refiere a procedimientos para la preparación de neo-tejidos y construcciones tisulares. En particular, la invención se refiere a la construcción de una estructura biológica de múltiples capas (por ejemplo, cualquier forma tridimensional) que incluye al menos una capa de matriz sembrada con células vivas.

5 I. Diseño general de un sistema para la producción de tejidos y construcciones tisulares

La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición que comprende una matriz que contiene células, originalmente recogidas de un órgano o tejido *in situ*, que se han expandido posteriormente (mediante cultivo celular *in vitro*) antes de sembrar dentro de dicha matriz. En una realización, esta composición, que comprende una matriz sembrada, se sitúa (como un casete) en un aparato de cultivo tisular (en un ejemplo un procesador tisular) de modo que las células dispuestas dentro de dicho sistema puedan expandirse en número y/o diferenciarse. No se pretende que la presente invención se limite a ningún tipo específico de célula. Dichas células son condrocitos que se multiplican y diferencian cuando se cultivan en condiciones que incluyen presión hidrostática cíclica.

La presente invención no se limita a una configuración específica. En una realización, sin embargo, la presente invención prepara un sistema que comprende dos capas.

La capa de soporte celular proporciona una plataforma que contiene las células sembradas en el sistema y proporciona soporte para dichas células a medida que ellas: a) se dividen y diferencian (en un aparato de cultivo tisular) en un neo-tejido y b) cuando dicho sistema se implanta en un huésped.

La capa de integración protege el neo-tejido a medida que se divide, *ex vivo*, en un aparato de cultivo tisular. Una vez que dicho neo-tejido se implanta en un huésped, la capa de integración se orienta para enfrentarse a una superficie tisular nativa de dicho huésped, exponiendo de este modo dicho neo-tejido al medio, incluyendo factores humorales (por ejemplo, hormonas y factores tróficos), en el sitio de trasplante.

En algunas realizaciones, el sistema también comprende una capa protectora que encapsula sustancialmente la capa de soporte celular y la capa de integración. El diseño de múltiples capas de los sistemas puede fabricarse en una diversidad de formas. En una realización, el sistema puede ser una lámina. En otra realización, el sistema puede formarse para aproximarse a la estructura tridimensional de un tejido u órgano como se observa *in vivo* incluyendo, pero sin limitación tubos, elipsoides y claviformes.

Los neo-tejidos (o "productos") propagados de acuerdo con los procedimientos enumerados en la presente invención replican sustancialmente tejidos nativos. Específicamente, los sistemas y procedimientos de la presente invención producen tejidos que reproducen sustancialmente la anatomía y fisiología de tejidos nativos. En una realización, los neo-tejidos preparados en la presente invención se propagan de células originalmente recogidas del huésped pretendido (por ejemplo, son autólogas). En algunas realizaciones las capas de integración y de soporte celular de la presente invención son biodegradables. En estas realizaciones, los componentes no celulares del sistema se biodegradan de modo que, tras su implantación en un huésped, sólo se integra el neo-tejido en el huésped.

Como se ha descrito anteriormente el sistema de múltiples capas comprende al menos dos capas, una capa de soporte celular y una capa de integración. En realizaciones seleccionadas, el sistema también incorpora una capa protectora. Cada una de estas capas se describe en más detalle posteriormente. Sin embargo, la presente invención también contempla la incorporación de capas complementarias en el sistema. Estas capas complementarias pueden contener una diversidad de factores tróficos incluyendo, pero sin limitación, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante P (por ejemplo, TGF β -1, TGF β -2, etc.), factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, PDGF-AA, PDGF-AB y PDGF-BB), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento de tipo insulina (IGF), factores de necrosis tumoral (TNF), factores estimulantes de colonias (CSF), factores de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factores pro-angiogénicos o anti-angiogénicos, y otros agentes terapéuticos incluyendo, pero sin limitación, citocinas, interleucinas (por ejemplo, IL-1, IL-2) u otros cofactores tales como heparina o calmodulina, antibióticos, agentes antineoplásicos y antibacterianos, para estimular adicionalmente o controlar la remodelación tisular o para combatir la sepsis.

En otras realizaciones, tales capas complementarias pueden proporcionar factores ontogénicos o morfogénicos tales como, proteínas morfogénicas del hueso (BMP 1-8); productos génicos de la familia de Hedgehog (hh); productos génicos de la familia de Hox; productos génicos de la familia de Pax; productos génicos de Notch; osteoprotegerina; y proteínas de unión a osteoprotegerina.

Es importante observar que aunque el diseño general del sistema de la presente invención posibilita un sistema que comprende más de una capa, la presente invención también contempla realizaciones que comprenden solamente la capa de soporte celular.

II. Los componentes del sistema de múltiples capas

1. La capa de soporte celular (y "matriz de TESS")

La capa de soporte celular de la presente invención (en una realización comercial específica denominada "matriz de TESS") comprende una matriz que facilita la propagación tridimensional de tejido y construcciones tisulares. La función de la capa de soporte celular es, en parte, proporcionar una plataforma de crecimiento para condrocitos. Las características deseables de la capa de soporte celular incluyen (pero sin limitación) biocompatibilidad, hidrofilia, y carga neutra. En una realización, la capa de soporte celular comprende una matriz (o estructura reticular de tipo panal) fabricada sustancialmente de colágeno de tipo I. En una realización preferida dicha matriz de colágeno de tipo I en panal se denomina "matriz de TESS".

No se pretende que esta capa de soporte celular se limite a ningún material o formulación específico. Por ejemplo, la matriz descrita en la Patente japonesa Nº 6.022.744 es adecuada para su uso como una capa de soporte celular como se describe en la presente invención. Esta matriz se prepara por gelificación de una solución de colágeno acuosa ácida con gas de amoníaco para formar un gel de colágeno y después liofilizar dicho gel para evaporar sustancialmente todo el agua, formando de este modo una matriz seca sustancialmente porosa.

En un ejemplo, se vierten 300 gramos de una solución de atelocolágeno acuosa al 1 % (mantenida a pH 3,0) en una bandeja de 10 x 20 cm. Esta bandeja se sitúa después en un recipiente de 5 litros. Se sitúa después un recipiente abierto de 50 ml que contiene 30 ml de una solución de amoníaco acuoso al 3 % junto a la bandeja, en la cámara de 5 litros, que contiene 300 gramos de dicha solución acuosa al 1 % de atelocolágeno. El recipiente de 5 litros (que contiene las bandejas abiertas de atelocolágeno y amoníaco) se sella después y se deja reposar a temperatura ambiente durante 12 horas. Durante este periodo el gas de amoníaco liberado del recipiente abierto de amoníaco acuoso, y confinado dentro del recipiente de 5 litros sellado, se hace reaccionar con el atelocolágeno acuoso, gelificando de este modo dicha solución acuosa de atelocolágeno.

Este gel de colágeno se lava después con agua durante una noche y, posteriormente, se liofiliza para producir una matriz de tipo esponja. Esta matriz liofilizada se corta después en cuadrados, se esteriliza y se almacena bajo una envoltura estéril.

La presente invención contempla matrices preparadas de acuerdo con otros protocolos. En una realización, se usará la matriz preparada de acuerdo con el protocolo expuesto en la Patente de Estados Unidos Nº 5.206.028 de Li. En otra realización, se usarán las matrices de colágeno preparadas de acuerdo con los protocolos expuestos en la Patente de Estados Unidos Nº 5.656.492 de Glowacki y col.

El tamaño de poro de estas matrices de colágeno puede ajustarse variando el pH de la dispersión, la concentración de colágeno y el ciclo de liofilización (por ejemplo, tiempo de congelación, intervalo de temperaturas y tiempo del ciclo). Véase, Patente de Estados Unidos Nº 4.522.753 de Yannas y col. Aunque no se pretende que la presente invención se limite a ningún mecanismo específico, el ajuste a tamaño de poro puede ser ventajoso en la promoción de la distribución uniforme de células con diferentes morfologías.

Por ejemplo, los condrocitos cultivados en una matriz de colágeno de tipo I muestran infiltración aumentada en dicha matriz cuando el tamaño de poro medio de dicha matriz era mayor de 100 micrómetros. Véase, Patente de Estados Unidos Nº 6.080.194 de Pachence y col. Aunque no se pretende que la capa de soporte de la presente invención se limite a un tamaño de poro específico, en una realización de la presente invención dicho tamaño de poro está en un intervalo de aproximadamente 50-500 micrómetros. En otra realización, el tamaño de poro está en un intervalo de 100-300 micrómetros. En otra realización, el tamaño del poro es de aproximadamente 200 micrómetros.

No se pretende que la presente invención se limite a una capa de soporte celular que comprende colágeno de tipo I. En otras realizaciones, las capas de soporte celular del sistema están compuestas de otros materiales, incluyendo (pero sin limitación): otros colágenos tales como colágeno de tipo II y tipo IV; geles de colágeno contraídos por células que contienen otros componentes de la matriz extracelular tales como, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, glicoproteínas (por ejemplo, fibronectina, laminina, etc.); elastina y/o factores de crecimiento peptídicos bioactivos o citocinas; otros biopolímeros tales como fibrina; fibras biodegradables sintéticas compuestas de tales polímeros como ácidos polilácticos o poliglicólicos, policaprolactonas o poliaminoácidos, o sus copolímeros; y estructuras de construcciones que comprenden colágeno y ácido poliláctico.

2. Componente de gel

En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, la matriz de soporte celular de la presente invención actúa como una esponja que capta por capilaridad (y distribuye uniformemente a lo largo de los intersticios de la matriz) células suspendidas en una solución de sol-gel en la que dicha solución de sol-gel está en su estado de sol. No se pretende que la presente invención se limite a un tipo específico de sol-gel. Sin embargo, las características preferidas de este sol-gel incluyen, pero sin limitación, una viscosidad (como un sol) que promueve la mezcla fácil de células en condiciones tales que se requieran fuerzas de cizallamiento solamente nominales para mezclar dichas células con dicho gel. En una realización preferida este sol-gel está sustancialmente compuesto de colágeno de tipo I y está disponible en el mercado (por ejemplo, VITROGEN producido por Cohesion Corporation de

Palo Alto, CA.). VITROGEN es un colágeno dérmico bovino solubilizado en pepsina purificado (es decir, 99.9 % puro) disuelto en HCl 0,012 N y mantenido como una solución estéril.

Otra característica preferida de este sol-gel es la capacidad para curarse (o cambiar) a una forma sólida, caracterizándose dicha forma sólida por una incapacidad sustancial para verterse o mezclarse libremente. No se pretende que la presente invención se limite a ningún mecanismo específico para curar dicho sol-gel a una forma sólida (por ejemplo, gel). En una realización, dicho curado comprende la aplicación de calor. En una realización preferida, el sol-gel se cura por la aplicación a una temperatura de aproximadamente 37 °C. En otras realizaciones dicho sol-gel puede curarse a una forma sustancialmente sólida mediante exposición a compuestos químicos o radiación ultravioleta.

En otra realización, la presente invención contempla el uso de geles vehículo polipeptídicos.

3. La capa de integración

El procedimiento de la presente invención también contempla una matriz de soporte, sembrada con células, que comprende además una capa de integración. La integración facilita la incorporación (*in situ*) de dicha matriz de soporte, sembrada con células, en una lesión o defecto en el cuerpo. En una realización, la capa de integración se pone en contacto con un órgano o tejido *in situ*. Es decir, la capa de integración forma una interfaz entre la matriz de soporte introducida (quirúrgicamente) sembrada con células y tejido u órgano *in situ* nativo de un receptor.

Dependiendo del tipo particular de células sembradas en la matriz de soporte y el tejido en el que se incorporarán dichas células, la capa de integración puede proporcionar funciones diferentes. En una realización, la capa protectora protege a la matriz sembrada con células implantada de señales endocrinas o paracrinas producidas por el tejido nativo del huésped. En otra realización la capa de integración puede configurarse para facilitar la transmisión de señales endocrinas o paracrinas del tejido nativo del huésped a la matriz sembrada con células implantada.

No se pretende que el procedimiento de la presente invención se limite a ningún mecanismo específico de acción para la capa de integración. En una realización, la capa de integración evita la infiltración de vasos sanguíneos y células no deseadas del tejido óseo subyacente en una matriz sembrada con condrocitos implantada en una articulación móvil de un huésped.

Al preparar la capa de integración de la presente invención, puede prepararse una barrera de colágeno densa de acuerdo con el procedimiento presentado en la Patente de Estados Unidos Nº 5.206.028. Una matriz de colágeno poroso, que tenga un grosor de aproximadamente 4 mm a 10 mm, se hidrata usando una cámara con humedad controlada (con una humedad relativa del 80 % a 25 °C) durante 60 minutos. El material de colágeno se comprime entre dos láminas de teflón a un grosor de menos de 0,2 mm. El material comprimido se reticula después en una solución de formaldehído al 0,5 %, bicarbonato sódico al 1 % a pH 8 durante 60 minutos. La membrana reticulada se aclara después exhaustivamente con agua, y se liofiliza durante aproximadamente 48 horas. La barrera de colágeno densa tiene una construcción interna de fibras densamente empaquetadas que se entrecruzan en una estructura de múltiples capas.

En otra realización, la capa de integración se prepara a partir de dispersiones o soluciones basadas en colágeno que se secan al aire en forma de láminas. El secado se realiza a temperaturas que varían de aproximadamente 4 a 40 °C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 7 a 48 horas.

En otra realización, la capa de integración está comprendida por un copolímero de polietilenglicol y colágeno que absorbe lentamente el líquido y se biodegrada lentamente. La naturaleza adhesiva del copolímero de polietilenglicol y colágeno puede permitir que el sistema se sitúe más eficazmente en, y adherirse a, una lesión o defecto.

No se pretende que la capa de integración enumerada en la presente invención se limite a un copolímero de polietilenglicol y colágeno. Por ejemplo, en otras realizaciones, la capa o las capas de integración del sistema pueden estar comprendidas por colágeno, fibrina, agarosa, alginato, quitina, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros de colágeno y fibrina. Además, la capa de integración puede incluir además materiales para promover, estimular o inhibir el crecimiento y desarrollo de tejidos y células específicos.

Los ejemplos de tales materiales incluyen (pero sin limitación): polvo de hueso desmineralizado, factores de crecimiento y desarrollo tales como proteínas morfogenéticas del hueso; factores de crecimiento epidérmico; enzimas que estimulan la alteración de la matriz extracelular, tales como condroitinasa ABC (Patente de Estados Unidos Nº 5.916.557); y factores pro-angiogénicos tales como factor de crecimiento de células endoteliales vasculares (VEGF).

En realizaciones de la presente invención diseñadas para promover la vascularización, la capa de integración de la presente invención puede contener factor anti-trombogénico tal como heparina, o materiales artificiales altamente cargados negativamente tales como copolímeros de estireno-etileno o butileno-etileno que producen un efecto anti-trombogénico.

En otra realización de la presente invención diseñada para promover la formación de tejido óseo (por ejemplo, en el que se siembran osteoblastos en la matriz de soporte) la capa de integración puede contener factores osteogénicos y/o polvo de hueso desmineralizado para estimular el tejido subcondral *in situ*.

4. La capa protectora

Los procedimientos preferidos de la presente invención también contemplan una matriz de soporte, sembrada con las células, que comprende además una capa protectora. La capa protectora encapsula la superficie externa de una matriz de soporte sembrada con células. La capa protectora aísla una matriz de soporte sembrada con células del traumatismo mecánico y fisiológico que, en algunas aplicaciones, se asocia con la implantación de una matriz sembrada con células en un huésped; permitiendo simultáneamente que los nutrientes se muevan a dicha matriz sembrada con células. En una realización, la capa protectora se aplica a la matriz sembrada con células antes y/o después de que dicha matriz se retire de un procesador tisular.

En una realización preferida, la capa protectora comprende una solución patentada, designada CT3, que se fabrica por Cohesion Technologies de Palto Alto, CA que se aplica sobre la superficie de una matriz sembrada con condrocitos que se ha retirado después de un periodo de cultivo dado en un procesador tisular. En una realización, un cirujano aplica esta CT3 en aerosol a hueso subcondral *in situ*. Al situar la capa de soporte celular, un cirujano sitúa el material polimérico en la lesión y, sin esperar a que se polimerice completamente, sitúa el neo-cartílago en posición. De este modo, la capa dirigida hacia el hueso subcondral sella el hueso subcondral y mantiene la capa de soporte celular (por ejemplo, neo-cartílago) en su sitio. La capa protectora externa que comprende dicho polímero se aplica después en una forma que polimeriza rápidamente, y se aplica de tal manera que la mantenga por debajo de la superficie móvil de la articulación para evitar que se desplace por fricción.

En una realización, una vez que el sistema se ha suministrado o implantado en el defecto o lesión diana, la capa protectora protege el nuevo tejido de fuerzas o procesos dirigidos hacia él desde la superficie funcional, facilitando de este modo la integración del soporte celular con el tejido nativo que rodea la lesión. Por ejemplo, cuando se usa para proteger neo-cartílago implantado, esta capa protectora puede sustituir a otros tipos de intervenciones quirúrgicas protectoras haciendo innecesaria la necesidad de retirar una capa fina del periostio del paciente de un hueso canalicular, y su aseguración posterior en su sitio sobre el sistema para contener el neo-cartílago.

En un sistema para la producción de neo-cartílago, es deseable además que la capa protectora esté cargada positivamente o cargada neutra para contener químicamente la matriz natural producida por el neo-cartílago a medida que se desarrolle y produce componentes cargados negativamente tales como condroitín sulfato y otros glicosaminoglicanos.

La capa protectora del sistema puede tomar diferentes formas. La utilización de una forma frente a las otras depende de la naturaleza de la lesión y el sitio de lesión en el que deba suministrarse, devolverse o implantarse el neo-tejido. En una realización la presente invención contempla una lesión o parte de una lesión, *in situ*, con dicha capa protectora para crear un revestimiento y posteriormente poner en contacto una matriz de soporte sembrada con células con dicho revestimiento.

No se pretende que la presente invención se limite a un sistema de múltiples capas que comprenda una capa protectora compuesta de ningún material específico. Por ejemplo, en una realización, la capa protectora comprende un sellante adhesivo que se aplica por el médico o cirujano después de situar la capa de integración y capa de soporte celular en la lesión, y no está, por lo tanto, unida al sistema en el momento de la siembra inicial de células. Para formar un sellado eficaz, es deseable que el sellante adhesivo se pulverice o se aplique con un instrumento tal como una jeringa de gran calibre de modo que el sellante adhesivo pueda manipularse fácilmente por el facultativo antes de la polimerización (o fijación) del copolímero.

Es deseable además que este material (es decir, sellante) sea capaz de resistir 0,01 – 15,00 MPa de tensión. El material usado para esta aplicación debería ser un polímero biológicamente fiable que con el tiempo se biodegradará en el cuerpo. Un ejemplo de un material que se prefiere es un copolímero (o construcción) de polietilenglicol y colágeno. De hecho, para las realizaciones de la presente invención en las que se siembran condrocitos en una matriz de colágeno, se prefieren sellantes basados en colágeno. Algunas de las ventajas de usar dicho copolímero (o construcción) en la capa protectora incluyen que dicho copolímero es eficaz, seguro, fuerte y duradero y que también puede usarse por el médico como un sellante quirúrgico después del suministro del sistema de múltiples capas o matriz (y las células correspondientes o neo-tejido) en la lesión diana.

En otra realización, la capa externa/protectora comprende una capa protectora de un sellante (es decir, material) pulverizado sobre la superficie del sistema de múltiples capas antes de cultivar dicho sistema, y después se refuerza con más del mismo material una vez que se sitúa en la lesión.

En otra realización, puede usarse cualquiera de las composiciones de polímeros biocompatibles de gelificación rápida descritas en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 20010055615 (correspondiente al N° de serie 09/293.708) de Wallace (publicada el 27 de diciembre de 2001) puede usarse como la capa protectora en la presente invención.

En otra realización más, la capa protectora comprende un material rígido, pero flexible, que puede aplicarse encajándolo en un sitio de lesión, sellando eficazmente la lesión y cumpliendo adicionalmente la función protectora. Dicha realización puede denominarse capa protectora de calaje. Los ejemplos de materiales adecuados para su uso en esta realización incluyen, pero sin limitación, formas de polilactato o copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico, y una estructura condensada no-tejida de N-glucosamina de diversos grados de acetilación. La presente invención contempla el uso de tales materiales bien usados individualmente o bien en combinación. Además, la presente invención contempla realizaciones adicionales en las que el sellante adhesivo (referido anteriormente) también puede usarse junto con dicha capa protectora de calaje como un sellante extra alrededor de la periferia del sistema insertado.

III. Dispositivos de cultivo tisular y procesadores tisulares

1. Incubadores convencionales

Los procedimientos de la presente invención emplean una diversidad de dispositivos de cultivo tisular. Se usan incubadores de cultivo tisular convencionales y ambientes de incubación para expandir (o multiplicar) células recogidas de tejidos u órganos. En una realización preferida, esta expansión de células se asocia con la retirada de células muertas y residuos celulares (por ejemplo, matriz extracelular nativa residual). Es decir, pueden usarse técnicas de cultivo tisular convencionales para seleccionar y multiplicar una población o poblaciones de células deseadas. Estas células expandidas pueden después incorporarse en las matrices de soporte celular tridimensionales enumeradas en la presente invención. En una realización preferida, por ejemplo, los condrocitos recogidos de cartílago articular se expanden en cultivo. Estos condrocitos expandidos se siembran después en la matriz de soporte sólido para formar una matriz sembrada. Esta matriz sembrada puede después situarse en un procesador tisular.

2. Procesadores tisulares

Un procesador tisular tiene la capacidad de regular/modificar las condiciones de cultivo tisular incluyendo la aplicación de presión hidrostática constante o cíclica, la recirculación del medio, y la regulación de la concentración de oxígeno. En una realización preferida dicho procesador tisular es el sistema de soporte de ingeniería tisular (TESS) descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada 20010021529 (correspondiente a la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 09/796.422) asignada a Takagi Industrial Co. Ltd.

El procesador TESS proporciona un aparato para cultivar células o tejido que comprende: una unidad de cultivo que tiene una cámara de cultivo que contiene células o tejido y medio de cultivo; un medio de aplicación de presión para aplicar presión a las células o tejido en la cámara de cultivo; y un medio de aporte de medio de cultivo para el aporte de suministro continuo o intermitente de medio de cultivo a la unidad de cultivo. (Véase la Figura 1 y el texto correspondiente de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 09/796.422). El procesador TESS también puede comprender un medio de control (por ejemplo válvula de despresurización) para controlar el medio de aplicación de presión o medio de aporte de medio de cultivo. Generalmente, la presión aplicada a las células o tejido se establece dependiendo del tipo de células o tejido para cultivar. El procesador TESS comprende además un medio capaz de absorber gases tales como nitrógeno, dióxido de carbono y oxígeno. Además, el procesador TESS comprende además un espacio sellado herméticamente que incluye un medio de calentamiento y un medio humidificador.

3. Aplicaciones de procesadores tisulares

Ciertas células son extremadamente difíciles de cultivar en cultivo tridimensional (3-D) de modo que puedan formar un neo-tejido (por ejemplo, neo-cartílago). El procesador TESS no solamente facilita el crecimiento y cultivo de estas células difíciles de cultivar sino que permite cultivar junto un cultivo mixto de células. Estas poblaciones mixtas de células pueden cultivarse en el TESS en condiciones tales que se auto-organicen en una construcción tisular que se acerque a la organización histológica de un órgano *in situ*. Aunque no se pretende que la presente invención se limite a ningún mecanismo o protocolo de cultivo tisular específico, el TESS perfunde al medio bajo presión, facilitando de este modo el suministro de oxígeno y nutrientes al interior de matrices 3-D sembradas con células.

Los neo-tejidos pueden estar compuestos de células humanas sanas o cancerosas. Las células cancerosas podrían usarse como un sistema modelo para explorar antineoplasia y permitir que el investigador desarrolle, *in vitro*, el régimen farmacológico óptimo antes de los ensayos clínicos.

Por ejemplo, un neo-tejido 3-D comprendido por células secretoras derivadas de epitelio y células del estroma derivadas de mesodermo podría aproximarse a la morfología de tejido de próstata *in situ*. Dicho neo-tejido de "tipo prostático" podría permitir que un investigador explorara, como un fármaco de represión de tumor de próstata, los muchos análogos de vitamina D.

Además, estos cultivos en 3-D podrían estar comprendidos por células cancerosas (a partir de un tumor metastatizado en un órgano) y células "normales" que son la diana para las metástasis de dichas células cancerosas, facilitando de este modo el estudio de interacciones metastásicas. Tales sistemas serían especialmente importantes en casos en los que la mortalidad de cáncer no resulte de un cáncer primario de células secretoras

epiteliales (por ejemplo, en cáncer de próstata o mama), sino de la transformación de hueso por interacción con células migratorias del sitio de cáncer primario. Dicho cultivo en 3-D sería valioso para evaluar los regímenes farmacológicos combinatorios indicados para metástasis de próstata (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos/represores de andrógenos tales como carboplatino).

5 IV. Visión de conjunto de la formación de neo-tejidos

La presente invención proporciona procedimientos para la formación de neo-tejido usando los componentes del sistema de múltiples capas descrito anteriormente. Más específicamente, estos componentes se combinan y se hacen reaccionar en condiciones tales que se produzca un neo-tejido tridimensional viable. La combinación y condiciones de reacción para estos componentes pueden variarse de acuerdo con el tipo de neo-tejido producido y la aplicación pretendida para este mismo neo-tejido. En una realización preferida, sin embargo, se produce neo-cartílago de acuerdo con el siguiente esquema.

1. Aislamiento de condrocitos de fuente tisular

Los condrocitos se aislaron enzimáticamente de cartílago recogido en condiciones estériles de las extremidades posteriores de cerdos de 6 meses de edad. El fémur se separó de la tibia y se expuso la cabeza de la tróclea. Se retiraron tiras de cartílago de la tróclea usando una hoja quirúrgica. El cartílago se picó, se digirió en una solución de colagenasa de tipo 1 al 0,15 % en DMEM: mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12) 1:1 con penicilina-estreptomicina al 1 % (P/S) y se agitó suavemente durante 18 horas a 37 °C. Se recogieron condrocitos y se aclararon dos veces con PBS por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos. Los condrocitos se resuspendieron en DMEM/F-12 complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (FBS) y P/S al 1 %.

20 2. Siembra de células en la matriz de TESS

Se incubaron condrocitos aislados durante un periodo de cinco días a 37 °C en un incubador convencional. Las células se recogieron después por tripsinización. Se sembró una suspensión celular de 150.000 células en 18 µl de solución de VITROGEN por matriz (teniendo dicha matriz un volumen aproximado de 19 µl) con nueve matrices por grupo. No se pretende que la presente invención se limite a un tamaño o forma de matriz de soporte celular o número de células específico. De hecho, en una realización de la presente invención, la matriz sembrada puede aumentarse de escala hasta un mayor volumen (en el que se siembra aproximadamente 1 µl de la suspensión celular descrita anteriormente en 1 µl de matriz). Las matrices del grupo de control se incubaron en un incubador a 37 °C y el grupo de ensayo se incubó en el TESS. (Véase, Ejemplo 1 y Tabla 1).

En otro ejemplo experimental, los condrocitos aislados se incubaron durante un periodo de cinco días a 37 °C en un incubador convencional. Las células se recogieron después por tripsinización. Se sembró una suspensión celular de 300.000 células en 18 µl de solución de VITROGEN por matriz (teniendo dicha matriz un volumen aproximado de 19 µl) con ocho matrices por grupo. No se pretende que la presente invención se limite a números de células o tamaño o forma de matriz de soporte celular específicos. De hecho, en una realización de la presente invención, la matriz sembrada puede aumentarse de escala hasta un mayor volumen (en el que se siembra aproximadamente 1 µl de la suspensión de células descrita anteriormente en 1 µl de matriz). Las matrices del grupo de control se incubaron en un incubador a 37 °C y el grupo de ensayo se incubó en el TESS. (Véase, Ejemplo 2 y Tabla 2).

3. Bioquímica (ensayo DMB)

Al final del cultivo se usaron seis matrices de cada grupo en el ensayo de bioquímica. Brevemente, las matrices se transfirieron a tubos de microcentrífuga y se digirieron en 300 µl de papaína (125 µg/ml en fosfato sódico 0,1 M, EDTA disódico 5 mM y L-cisteína-HCl 5 mM) durante 18 horas a 60 °C. Se midió la producción de GAG en las matrices usando un microensayo de azul de dimetileno modificado (DMB) con condroitín sulfato de tiburón como un control (referencia: Connective Tissue Research, 1982, vol. 9, págs. 247-248)

4. Histología

Las matrices restantes de cada grupo se fijaron en paraformaldehído al 4 %. Las matrices se procesaron y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de 10 µm en un microtomo y se tiñeron con safranina-O (Saf O).

V. Protocolos preferidos para crecimiento de neo-tejido

La presente invención contempla protocolos para el crecimiento (es decir, *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*) de neo-tejidos, usando el componente del sistema de múltiples capas descrito en la presente solicitud. En realizaciones preferidas, el procesador TESS se usa para suministrar presión hidrostática constante o cíclica a la matriz sembrada con células. En esta realización preferida, estas matrices sembradas con células se mantienen en fase de reposo (en un ejemplo en un incubador convencional o procesador TESS mantenido a 37 °C a presión atmosférica) posterior a exposición a presión hidrostática constante o cíclica.

1. Producción de neo-cartílago

En una realización preferida, se siembran condrocitos de cerdo autólogos en la matriz de soporte celular y se incuban bajo presión hidrostática cíclica a 37 °C y CO₂ 5 %. En esta realización preferida, dicha presión hidrostática cíclica es de aproximadamente 3,0 MPa de presión a 0,5 Hz. En esta realización preferida la duración de dicha presión cíclica es de aproximadamente 6 días seguido de una fase de reposo de 12 días en un incubador mantenido a 37 °C a presión atmosférica. Al final de esta fase de reposo, las matrices se recogieron para análisis bioquímico e histológico como se describe en el Ejemplo 1 y Ejemplo 2.

2. Protocolo alternativo

En otra realización, la presente invención contempla un algoritmo para el crecimiento (es decir, *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*) de células, usando los componentes de la presente invención, que implica la aplicación de presión hidrostática a cartílago *in situ* aislado (o condrocitos adheridos a una matriz) y sometidos al régimen que comprende la aplicación cíclica de presión hidrostática durante aproximadamente 1-8 horas seguido de aproximadamente 16-23 horas de periodo de recuperación.

3. Concentración de oxígeno reducida

En una realización alternativa la matriz de soporte celular sembrada con condrocitos descrita anteriormente puede cultivarse a concentración de O₂ reducida (es decir, menos del 20 % de saturación) durante la formación de neo-cartílago en el procesador TESS. Aunque no se pretende que la presente invención se limite a ningún mecanismo específico, la concentración de oxígeno reducida de cartílago, observada *in vivo*, puede deberse a su falta (normal) de vascularización que produce una presión parcial de oxígeno menor (en comparación con los tejidos adyacentes). En una realización, se cultivan neo-tejidos a concentración de oxígeno entre aproximadamente el 0 % y aproximadamente el 19 % de saturación. En otra realización, dicha concentración de oxígeno es de aproximadamente el 2 % de saturación.

VI. Aplicaciones médicas

Los procedimientos de la presente invención preparan construcciones tisulares que son adecuados para su uso en una diversidad de aplicaciones médicas. En una realización, la matriz sembrada con células curada con calor preparada en la presente invención puede implantarse *in vivo* para reparar células o tejido dañado. En otra realización, la matriz sembrada con células curada por calor preparada por la presente invención puede reemplazar o aumentar tejido existente o unir entre sí tejidos o estructuras biológicas como se describe posteriormente.

1. Aplicaciones de reparación tisular

No se pretende que el uso de los procedimientos de la presente invención para preparar tejido, se limite a la reparación, reemplazo, reconstrucción o aumento de ningún tipo tisular (o celular) específico. Por ejemplo, en una realización, se repara, reemplaza, reconstruye o aumenta tejido cartilaginoso dañado. En otra realización, se reparan, reemplazan, reconstruyen o aumentan defectos tisulares producidos por tumor, traumatismo, infección o malformación congénita (que implica diversos tipos tisulares o celulares).

A. Reparación de cartílago

Aunque la presente invención es útil en procedimientos para la reparación de defectos cartilaginosos de grosor completo, también puede dirigirse a la reparación de defectos de grosor parcial. Además, los procedimientos de la presente invención pueden combinarse con técnicas para formar moldes de áreas con defectos de modo que puedan producirse neo-tejidos formados a medida, que se adaptan y ajustan dimensionalmente para el defecto de un paciente particular. Además, los sistemas y procedimientos de la presente invención pueden usarse para crear estructuras cartilaginosas completas tales como meniscos, o pueden usarse para crear materiales para reemplazo parcial o total de una superficie articular. En otras realizaciones, pueden estar disponibles neo-tejidos cartilaginosos (es decir, neo-cartílago) de acuerdo con la presente invención para combinar con materiales aloplásticos para formar articulaciones artificiales. En una realización, los neo-tejidos cartilaginosos (es decir, neo-cartílago) descritos en la presente invención repararán y/o reemplazarán tendones y ligamentos. En una realización específica dicho ligamento es el ligamento cruzado anterior (ACL). En otra realización, los neo-tejidos cartilaginosos (es decir, neo-cartílago) descritos en la presente invención repararán y/o reemplazarán discos vertebrales.

Los procedimientos de la presente invención pueden ser adaptables a formación de construcciones de neo-tejidos combinando, por ejemplo, cartílago formado y hueso formado para usarse para reemplazo de una superficie articular completa incluyendo hueso subcondral, o se usarán para reemplazo de un hueso pequeño cubierto de cartílago tal como puede hallarse en la muñeca. Bien usadas para formar neo-tejido cartilaginoso, o bien para formar construcciones de neo-tejido, estas composiciones pueden moldearse en estructuras implantables para reemplazo total de la articulación y para reemplazo de media articulación en articulaciones pequeñas tales como las de la mano o la articulación temporomandibular.

En otra realización, estos procedimientos pueden usarse para crear un neo-tejido cartilaginoso, de grosor completo, implantable para situar en una articulación que soporte un gran peso tal como la rodilla. Pueden utilizarse provechosamente procedimientos artroscópicos en la recogida de condrocitos nativos para incorporar en un neo-tejido formado por estas composiciones y procedimientos.

- 5 Se empleará un primer procedimiento artroscópico para evaluar el alcance del defecto cartilaginoso potencial y para recoger condrocitos nativos para cultivo y suministro posterior a la matriz de soporte celular preparada por la presente invención. Basándose en un molde formado en el momento del primer procedimiento artroscópico, o basándose en mediciones realizadas durante el procedimiento, se formará un modelo dimensional del defecto anticipado y el neo-tejido se formará para adaptarse en tamaño y forma a este modelo.
- 10 Se llevará a cabo un segundo procedimiento artroscópico para desbridar un área dañada del cartílago nativo *in situ* y reemplazar el área dañada con el neo-cartílago preparado de acuerdo con la presente invención.

Se emplearán otras adaptaciones de técnicas quirúrgicas convencionales en otros sitios anatómicos para recoger celdas de cartílago nativo, para desbridar tejido cartilaginoso dañado, para crear un defecto dentro de la superficie articular del huésped (por ejemplo incluyendo una escisión completa de una superficie de articulación o una escisión parcial de una superficie de articulación), para implantar neo-tejido en el defecto del huésped y para conservar el neo-tejido en ese sitio.

- 15

B. Reparación de defectos tisulares

Se conocen bien defectos producidos por tumor, traumatismo, infección o malformación congénita, en las técnicas médica y quirúrgica. La reconstrucción de tales defectos puede requerir reemplazo de tejido de grosor completo, o puede requerir reemplazo de construcciones tisulares. Por ejemplo, en una realización, puede ser necesario reconstruir una escisión tomada del párpado inferior (por ejemplo, en el caso de un carcinoma de células basales) por un procedimiento de colgajo extensivo que "emplea" tejidos adyacentes o tejidos del párpado superior. Como alternativa, pueden emplearse procedimientos de injerto usando los otros párpados o el septo nasal como sitios donadores (a pesar del hecho de que puede haber problemas de sitio donador, y que se requerirá cierto reordenamiento tisular local en el área reconstruida).

- 20
- 25

La presente invención puede adaptarse para reparar estos defectos. Por ejemplo, puede situarse una construcción neotisular que proporcione tanto neo-cartílago como una capa de cobertura (conjuntiva o epidérmica) en dicho defecto para simplificar la tarea de reconstrucción. Como alternativa, un neotejido que comprenda las tres capas de tejido del párpado podría omitir la necesidad de ningún reordenamiento tisular local sustancial. Un neo-tejido que comprendiera neo-cartílago obviaría la necesidad de recoger un injerto de cartílago de otro sitio con los consecuentes riesgos para el sitio donador.

- 30

En otra realización, se reparará un defecto de deformación de septo nasal usando neo-cartílago. La reparación de fístulas persistentes después de procedimientos de fisura del paladar también puede ser susceptible de tratamiento con el neo-cartílago descrito en la presente invención. Estas fístulas provocadas por reparaciones de fisuras del paladar pueden requerir reconstrucción usando una construcción tisular con dos capas mucosas externas que cubren una capa ósea interna.

- 35

En otra realización, los neo-tejidos preparados en la presente invención también se adaptarán a problemas reconstructivos difíciles. Usando los procedimientos de la presente invención podría producirse mucosa oral en cantidades significativas para rellenar o recubrir defectos intraorales con un tejido especializado que tenga características funcionales apropiadas para la localización intraoral. También puede realizarse reconstrucción de otras áreas especializadas tales como lecho de las uñas y cartílago articular para articulaciones grandes y pequeñas usando las composiciones y procedimientos de la presente invención. La presente invención también puede proporcionar soluciones reconstructivas para articulación temporomandibular dañada o pueden aplicarse para reparar enfermedades degenerativas tales como artritis reumatoide.

45 C. Ligamento y tendón

Los procedimientos de la presente invención se adaptarán a la producción de tendón y ligamentos *in vitro*. En una realización, esto se promoverá mediante el estiramiento de células progenitoras de ligamento y tendón, sobre un armazón, *ex vivo* durante el desarrollo exógeno de ligamento o tendón. Los ligamentos contemplados por la presente invención derivarán de células progenitoras de ligamentos, células madre mesenquimales, o fibroblastos especialmente fibroblastos derivados de las células de la vaina que rodean al ligamento y el tendón, o fibroblastos o tenocitos derivados del ligamento o tendón en sí mismos. Pueden usarse ligamentos y tendones autólogos para reemplazar ligamentos y tendones dañados en el propio cuerpo del paciente sin miedo a respuesta inmune u otras respuestas adversas.

- 50

El armazón estirado, al que se ha hecho referencia anteriormente, puede considerarse otra capa de la composición de múltiples capas descrita en la presente invención. Este armazón permitirá a las células progenitoras estirarse *ex vivo* (por ejemplo en un procesador TESS modificado) para aplicar un estímulo físico que provoque que produzcan proteínas y componentes de la matriz que sean coherentes con verdaderos neo-ligamentos o neo-tendones.

- 55

En una realización, el armazón que se estira consistirá en un material fibroso que puede resistir tensiones de tracción que quedan dentro del intervalo de las tensiones de tracción a las que se someten normalmente el cartílago y el ligamento en el transcurso de la vida. Más específicamente, el material fibroso puede resistir un intervalo de tensiones de tracción que son necesarias para inducir que dichas células comiencen a producir los productos

- 5 génicos normales en la relación correcta que diferencia ligamento y tendón de otros tejidos u órganos, y que permite que estos productos génicos tomen la orientación y condición física, de modo que se pueda desarrollar un ligamento o tendón sano y morfológicamente fiable en dicho armazón. Además, el material fibroso debería tener un grado de elasticidad que pueda acomodar la cantidad de estiramiento de células progenitoras requerido para inducir que dichas células formen neoligamento o neotendón.
- 10 El ligamento y tendón desarrollados sobre dicho armazón adquirirán una fuerza de tracción, una elasticidad y una estructura para soportar hueso y músculo *in vivo*, que es equivalente a la fuerza de tracción y estructura de ligamento y tendón desarrollados dentro del cuerpo durante el transcurso normal de crecimiento y diferenciación. El armazón también se diseña para que una vez que el neoligamento o neotendón sea suficientemente funcional, el armazón reintroduzca el ligamento o tendón en la lesión y lo soporte hasta que se integre en el cuerpo. En una
- 15 realización el armazón se degradará después de la implantación.

En una realización, las células situadas en el armazón se seleccionarán de células en un estadio en su vida de desarrollo de modo que (cuando se sitúan en el armazón y se someten a las condiciones físicas y químicas de un aparato de cultivo tisular tridimensional diseñado para inducir diferenciación de cartílago y ligamento) estas células produzcan sustancialmente todos los productos génicos elaborados por ligamentos o tendones morfológicamente

- 20 fiables.

En una realización, el armazón se selecciona de una diversidad de materiales, incluyendo pero sin limitación, poliésteres (incluyendo polialquinoatos), poliglicolatos, polilactatos, materiales de sutura biodegradables. También pueden ser adecuados otros materiales siempre que estos materiales puedan degradarse de forma segura dentro del cuerpo, y siempre que los productos de degradación no interfieran con la función metabólica normal del cartílago y ligamento o el tejido circundante.

- 25

Es necesario que la estructura física del armazón sea coherente con su función pretendida (por ejemplo la aplicación uniforme de fuerza de tracción en el nivel celular (micrométrico)). Estas tensiones son muy suaves en comparación con las tensiones a las que se somete el cartílago o ligamento maduro. También es importante que la estructura fibrosa resista la ruptura a las fuerzas de tracción requeridas. En una realización, se entrelazarán fibras de 1-10 micrómetros de diámetro en una diversidad de patrones de entrelazado incluyendo, pero sin limitación, un entrelazado sólido, un entrelazado de centro hueco (tal como el entrelazado de rompecabezas chino) de modo que la aplicación de fuerza de tracción a los extremos del armazón produzca un estiramiento uniforme de la superficie del armazón. Para producir un ligamento con sus propios puntos de anclaje de hueso sería posible incorporar en los extremos polares del armazón tales sustancias como polvo de hueso desmineralizado, que se induciría bajo el estímulo físico correcto que formara hueso para incorporar en el hueso existente cuando se sitúa *in situ* en el

- 30
- 35

D. Otras aplicaciones

Los procedimientos de la presente invención también pueden usarse como modelo para dilucidar el mecanismo de ciertas enfermedades. Por ejemplo, en una realización, los sistemas de múltiples capas de la presente invención también pueden usarse como modelos para el estudio de condiciones fisiológicas o patológicas *in vitro*. Por ejemplo, en una realización de la invención el sistema puede usarse como un modelo para la barrera hematoencefálica. En otra realización, puede usarse un cultivo tridimensional de epitelio de mucosa (producido usando las composiciones y procedimientos de la presente invención) como un sistema modelo para estudiar infección por virus del herpes o virus del papiloma. Dicho sistema modelo podría usarse para ensayar la eficacia de medicamentos antivirales.

- 40

Como alternativa, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para estudiar la farmacocinética de diversos fármacos y factores de crecimiento. Por ejemplo, los neotejidos preparados en la presente invención también pueden usarse para la exploración *in vitro* de compuestos citotóxicos, alérgenos, factores de crecimiento y reguladores, compuestos farmacéuticos. Para este fin, el neotejido puede mantenerse *in vitro* y exponerse al compuesto para ensayar. Por ejemplo, la actividad de un compuesto citotóxico puede medirse por su capacidad para dañar o matar células en cultivo. Esto puede evaluarse fácilmente por técnicas de tinción vital conocidas.

- 45
- 50

El efecto de los factores de crecimiento o reguladores puede evaluarse analizando el contenido celular de un neotejido, por ejemplo, por recuentos celulares totales y/o recuentos celulares diferenciales. Esto puede conseguirse usando técnicas citológicas y/o histológicas convencionales incluyendo el uso de técnicas de inmunocitoquímica que emplean anticuerpos que definen antígenos celulares específicos de tipo. Puede evaluarse el efecto de diversos fármacos en células normales cultivadas en el sistema tridimensional. Por ejemplo, los fármacos que aumentan la formación de glóbulos rojos pueden ensayarse en cultivos de médula ósea tridimensionales. Los fármacos que afectan al metabolismo del colesterol, por ejemplo reduciendo la producción de colesterol, podrían ensayarse en el sistema de hígado tridimensional. Los cultivos tridimensionales de células tumorales pueden usarse como sistemas modelo para ensayar, por ejemplo, la eficacia de agentes antitumorales.

- 55

Los procedimientos de la presente invención también pueden usarse en el diagnóstico y tratamiento de tumores malignos y enfermedades. Por ejemplo, puede tomarse una biopsia de cualquier tejido (por ejemplo, médula ósea, piel, hígado, etc.) de un paciente que se sospecha que tiene un tumor maligno. Si las células de la biopsia se cultivan en el sistema de la invención, las células malignas pueden expandirse por clonación durante la proliferación de dicho cultivo, aumentando de este modo las probabilidades de detectar un tumor maligno y, por lo tanto, aumentando la precisión del diagnóstico y puntualidad del tratamiento. Dicha aplicación de la presente invención puede ser especialmente útil en enfermedades tales como el SIDA en las que la población de células infectadas está empobrecida *in vivo*. Además, en dicho caso, el cultivo del paciente podría usarse *in vitro* para explorar compuestos (por ejemplo compuestos citotóxicos o farmacéuticos) para identificar los que son más eficaces (es decir los que destruyen las células malignas o enfermas, pero evitan las células normales). Estos agentes podrían usarse después para tratar terapéuticamente al paciente.

VII. Realizaciones alternativas

Aunque ciertas realizaciones del sistema de múltiples capas para producir neotejidos o construcciones de neotejidos comprenden una construcción de tres capas, la presente invención también contempla sistemas de múltiples capas que comprenden más de tres capas.

Por ejemplo, al producir un neotejido o construcción de neotejido, las capas del sistema de múltiples capas pueden disponerse para incluir: una capa inferior de unión al tejido; una segunda capa que soporta una matriz biológica, en la que reside un primer tipo de células tisulares; una tercera capa de integración desplegada sobre la segunda capa para integrar la segunda capa con una capa adicional de matriz biológica, en la que reside un segundo tipo de célula tisular; y una capa superior protectora dispuesta sobre la capa adicional de matriz biológica. Dicha disposición podría proporcionar una construcción tisular que incluyera una capa de cartílago protegida por una capa de mucosa. Preferentemente, la capa de integración se formaría de un material que potenciaría la unión normal de la capa de cartílago y la capa mucosa de modo que su comportamiento unitario en condiciones fisiológicas replicaría el comportamiento del tejido nativo.

También se contemplan estructuras más complejas con múltiples matrices de soporte celular sembradas con células de al menos dos tipos tisulares, con capas de integración situadas entre cada matriz. Por ejemplo, podría fabricarse una construcción tisular del septo nasal (de acuerdo con estos principios) con una capa mucosa externa, una capa cartilaginosa interna y una segunda capa mucosa externa.

En otra realización, puede producirse una construcción de neotejido de acuerdo con la presente invención que incluye las tres capas del septo nasal.

En otras realizaciones, los neotejidos preparados por la presente invención pueden moldearse en una diversidad de formas. Por ejemplo, pueden formarse estructuras tubulares tales como vasos sanguíneos, canales u otros conductos especializados (por ejemplo uréter, esófago, etc.) esculpiendo un neotejido alrededor de un mandril u otra estructura en forma de tubo.

En otras realizaciones los procedimientos de la presente invención podrían usarse para crear estructuras lumenales, tubulares o cilíndricas tales como, por ejemplo, un vaso sanguíneo de múltiples capas.

En otra realización, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para producir una réplica de un tendón o un ligamento (es decir neotendón o neoligamento). El sistema de múltiples capas de la presente invención puede formarse dentro de un tubo de guía externo para producir una estructura que replique funcionalmente un tendón. Para moldear un neoligamento se puede insertar una matriz de soporte celular sembrada en un tubo de guía externo que actuaría como un molde de modelado para el neoligamento. En otra realización, puede emplearse un mandril que se degrade lentamente usando un material como ácido poliglicólico láctico (PGLA).

En otra realización más los procedimientos de la presente invención pueden usarse para formar una réplica tisular de la mucosa oral (es decir neomucosa). El sistema para formar mucosa oral puede incluir una matriz para soportar el crecimiento y diferenciación de queratinocitos, y también puede incluir una capa protectora dirigida hacia la superficie funcional de la mucosa oral (es decir hacia la cavidad oral). Dicha capa protectora se construiría para proteger la capa de soporte celular subyacente del impacto químico y enzimático de contacto con una saliva, así como, de fuerzas físicas inherentes en la localización anatómica intraoral.

El sistema para formar mucosa oral puede incluir además una capa de integración adaptada para facilitar la unión de las células formadas en la capa de soporte celular con el hueso subyacente. La capa de integración puede, por ejemplo, incluir factores osteogénicos o polvo de hueso desmineralizado para estimular e inducir el desarrollo de ligamento de hueso y periostio. Como otro ejemplo, esta capa puede comprender dermis cadavérica incluida en (o estratificada con) factores osteogénicos o polvo de hueso desmineralizado.

En otra realización, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para formar una réplica de tejido de la piel (por ejemplo neoepidermis o neodermis). Por ejemplo, puede proporcionarse una capa de soporte celular que permita el crecimiento y la diferenciación de queratinocitos en epitelio estratificado, queratinizado. Fijada a dicha capa de soporte celular puede haber una capa de integración que contenga además fibroblastos, factores de

crecimiento y materiales nutrientes apropiados capaces de producir una réplica tisular de la dermis (es decir neodermis). La capa de integración puede adaptarse adicionalmente para unir la réplica de tejido cutáneo con su lecho tisular subyacente.

- 5 Un neot Tejido de piel puede tener numerosos usos médicos. Por ejemplo, dicho neot Tejido puede usarse en cirugía aguda o reconstructiva de quemaduras, en la reconstrucción de escisiones, o en el tratamiento de heridas crónicas o llagas por presión.

10 En una realización adicional, el sistema de múltiples capas de la presente invención se moldea en una construcción tisular *in vitro* para explorar compuestos citotóxicos y farmacéuticos, y para evaluar las respuestas biológicas a citocinas y factores del crecimiento/reguladores. Por ejemplo, una construcción tisular que se aproxima a la forma y función de una glándula prostática de ser humano o animal no humano (es decir una neopróstata o neoglándula como se caracteriza por un compuesto de células del estroma y glandulares puede comprender un sistema, que incluye una capa protectora y múltiples capas de soporte celular. En dicha realización, la capa protectora puede actuar para contener el neoórgano dentro de un volumen deseado y ayudar a conservar su forma e integridad. Dicho sistema puede opcionalmente tener una capa de integración. La capa de integración puede anclar el sistema, por ejemplo, en el sustrato de cultivo *in vitro* empleado (por ejemplo una placa de cultivo, matraz, portaobjetos, etc.).

15 Cada capa de soporte celular puede proporcionar un tipo celular principal presente en (y recogido de) la glándula prostática nativa. Los ejemplos de tales tipos celulares incluyen, pero sin limitación, epitelio secretor de glándula prostática, músculo liso del estroma y tejido conectivo fibroso. Para formar un neoórgano con dimensiones que se aproximan a las de la glándula prostática nativa, puede moldearse un sistema de múltiples capas para incluir una

20 capa protectora, una capa de integración opcional, y una pluralidad de capas de soporte celular. Dicha pluralidad de capas de soporte celular pueden comprender, por ejemplo, varios conjuntos de tres capas de soporte celular apilados entre sí y desplegados dentro de un sistema único. La combinación de tipos celulares puede aproximarse a la estructura y función de la glándula prostática *in situ*.

Parte experimental

- 25 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplo 1

30 Este ejemplo proporciona un caso en el que los tejidos se formaron *in vitro* en una realización de la presente invención. Brevemente, se aislaron de forma enzimática condrocitos articulares de cerdo (sAC) de cartílago con colagenasa de tipo I. Las células se suspendieron en colágeno (VITROGEN) como se ha descrito anteriormente y se introdujeron por capilaridad en el elemento de esponja en panal de la matriz de soporte celular (por ejemplo la matriz de TESS). Las células se incubaron en su soporte tridimensional (es decir, la matriz de TESS) a 37 °C, CO₂ 5 % y O₂ 20 %. Después de 24 horas, algunas de estas matrices celulares (es decir capas de soporte celular que comprendían el grupo de ensayo) se transfirieron al procesador TESS™ y se incubaron a 3,0 MPa de presión hidrostática cíclica como se ha descrito anteriormente durante 6 días seguido de una fase de reposo de 12 días.

El grupo de control comprendido por matrices de TESS sembradas con condrocitos se incubó durante 18 días a 37 °C, CO₂ 5 % y O₂ 20 % y a presión atmosférica.

40 Al final del periodo de cultivo, las matrices se recogieron para análisis bioquímico e histológico como se observa en la Tabla 1. Para análisis bioquímico, se midió la producción de glicosaminoglicanos (GAG) usando un microensayo de azul de dimetilmetileno modificado (DMB). La Figura 1, descrita en la "Descripción de los Dibujos" de la presente memoria descriptiva, representa, en forma gráfica, los datos expuestos en la Tabla 1. Para análisis histológico, se midió la formación de neot Tejido por tinción con Safranina-O. La histología del grupo de control se ilustra en la Fig. 2A. La histología del grupo de ensayo se proyecta en la Fig. 2B.

Tabla 1

Grupo (n = 8 matrices por grupo)	Condiciones de Presión		Días totales en cultivo	Producción de GAG (µg/ml) (media +/- DT) (n = 6 matrices)
	En procesador TESS (Presión Cíclica 3 MPa, a 0,5 Hz)	En incubador (Presión Atmosférica)		
Control	-	18 días	18	4,71 ± 0,71
Ensayo	6 días	12 días	18	14,11 ± 1,10

NOTA: 1) Todos los cultivos se incubaron a 37 °C, CO₂ 5 % y O₂ 20 %.

2) En cultivo en TESS, el caudal del medio fue de 0,05 ml/min.

3) Se recogieron dos matrices de cada grupo para análisis histológico.

Ejemplo 2

Este ejemplo proporciona otro caso en el que los tejidos se formaron *in vitro* en otra realización de la presente invención. Se aislaron de forma enzimática condrocitos articulares de cerdo (sAC) de cartílago con collagenasa de tipo I. Las células se suspendieron en colágeno (VITROGEN) como se ha descrito anteriormente (por ejemplo 300.000 células en 18 µl de VITROGEN) y se introdujeron por capilaridad en el elemento de esponja en panal de la matriz de soporte celular (es decir la matriz de TESS), teniendo cada matriz un volumen de aproximadamente 19 µl.

Las células en su matriz de soporte celular se incubaron a 37 °C, CO₂ 5 % y O₂ 20 %. Después de 24 horas, algunas de estas matrices celulares (el grupo de ensayo) se transfirieron al procesador TESS™ y se incubaron a 3,0 MPa de presión hidrostática cíclica como se ha descrito anteriormente durante 6 días seguido de incubación durante 12 días a presión atmosférica a 37 °C, CO₂ 5 % y O₂ 20 %.

Las matrices celulares restantes que comprendían el grupo de control se incubaron a presión atmosférica durante 18 días a 37 °C, CO₂ 5 % y O₂ 20 %.

Al final del periodo de cultivo, las matrices se recogieron para análisis bioquímico e histológico como se observa en la Tabla 2. Para análisis bioquímico, se midió la producción de glicosaminoglicanos (GAG) usando un microensayo de azul de dimetilmetileno modificado (DMB). La Figura 4, descrita en la "Descripción de los Dibujos" de la presente memoria descriptiva, representa, en forma gráfica, los datos expuestos en la Tabla 2. Para análisis histológico, se midió la formación de neot Tejido por tinción con Safranina-O. La histología del grupo de control se ilustra en la Figura 3A. La histología del grupo de ensayo se proyecta en la Figura Fig. 3B.

Tabla 2

Grupo (n = 8 matrices por grupo)	Condiciones de Presión		Días totales en cultivo	Producción de GAG (µg/ml) (media +/- DT) (n = 6 matrices)
	En TESS (Presión Cíclica 3 MPa, a 0,5 Hz)	En incubador (Presión Atmosférica)		
Control	-	18 días	18	19,24 ± 2,14
Ensayo	6 días	12 días	18	25,44 ± 1,37

NOTA: 1) Todos los cultivos se incubaron a 37 °C, CO₂ 5 % y O₂ 20 %.
 2) En cultivo en TESS, el caudal del medio fue de 0,05 ml/min.
 3) Se recogieron dos matrices de cada grupo para análisis histológico.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparación de una construcción tisular implantable, comprendiendo dicho procedimiento:
 - (a) proporcionar una estructura de múltiples capas implantable que comprende:
 - (i) una capa de integración; y
 - (ii) una capa de soporte celular que comprende una matriz de esponja, estando la capa de soporte celular unida operativamente a la primera capa de integración; y
 - (b) introducir una solución que comprende condrocitos suspendidos en dicha estructura de múltiples capas para crear un dispositivo sembrado; y
 - (c) cultivar dicho dispositivo sembrado en condiciones que comprenden una presión hidrostática cíclica con una fase de reposo a presión atmosférica durante uno a sesenta días.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la estructura de múltiples capas implantable comprende además:
 - (iii) una capa protectora que aísla una superficie externa de la capa de soporte celular, estando la capa protectora unida operativamente a la capa de soporte celular y la capa de integración.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos condrocitos se suspenden en una solución de colágeno de Tipo 1 acuosa.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicha solución es un sol-gel.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicho sol-gel está al menos parcialmente gelificado.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dicho cultivo da como resultado la activación de dichos condrocitos para elaborar productos génicos asociados con una matriz extracelular.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la fase de reposo es de cuatro a veintiún días.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho cultivo se realiza bajo la presión hidrostática cíclica de 3 MPa a 0,5 Hz durante seis días seguido de doce días de la fase de reposo.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha matriz de esponja de dicha capa de soporte celular se compone de un colágeno de Tipo 1 en panal biodegradable.
10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la capa de integración comprende un copolímero de polietilenglicol y colágeno, colágeno, fibrina, agarosa, alginato, quitina, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, un copolímero de ácido poliláctico, un copolímero de ácido poliglicólico, un copolímero de colágeno o un copolímero de fibrina.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho colágeno de Tipo 1 en panal biodegradable se prepara a partir de colágeno de Tipo 1 gelificando una solución acuosa ácida de colágeno de Tipo 1 con gas de amoníaco para formar un gel de colágeno y liofilizando dicho gel para dar una matriz seca porosa.
12. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha matriz sembrada se cultiva en concentración de oxígeno reducida de menos del 20 % de saturación.

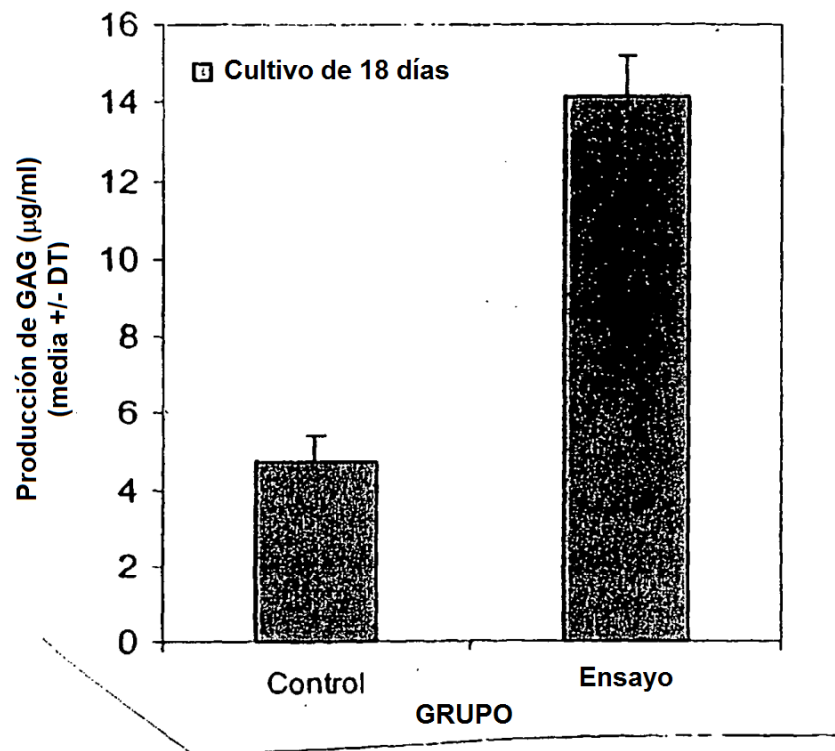


FIG. 1



FIG. 2A

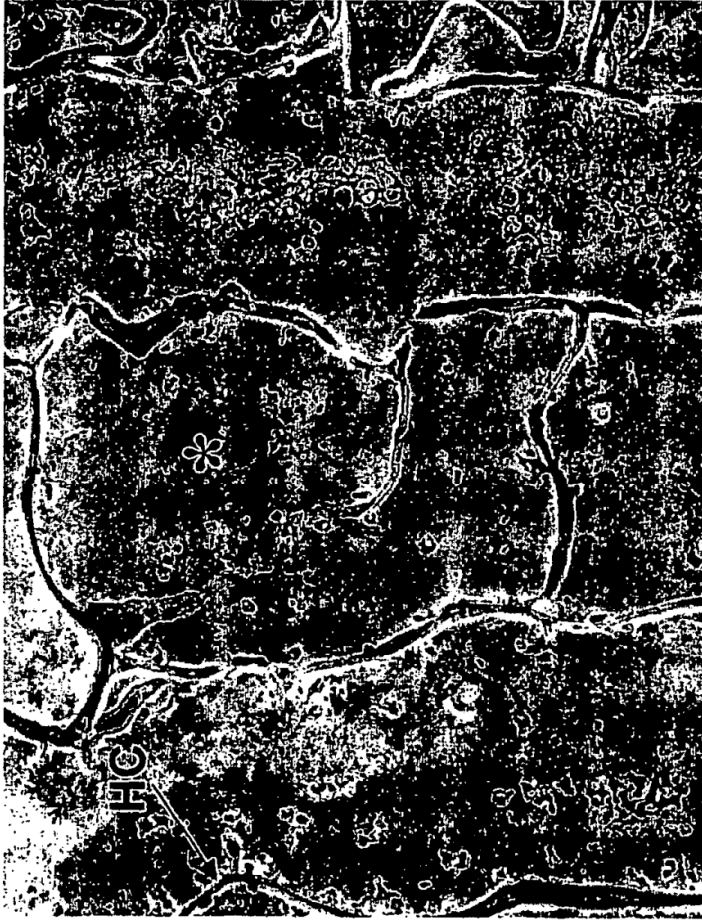


FIG. 2B

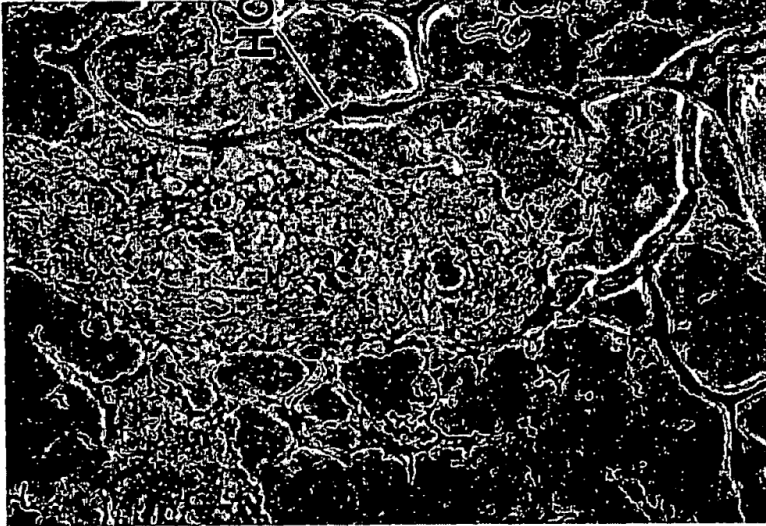


FIG. 3A



FIG. 3B

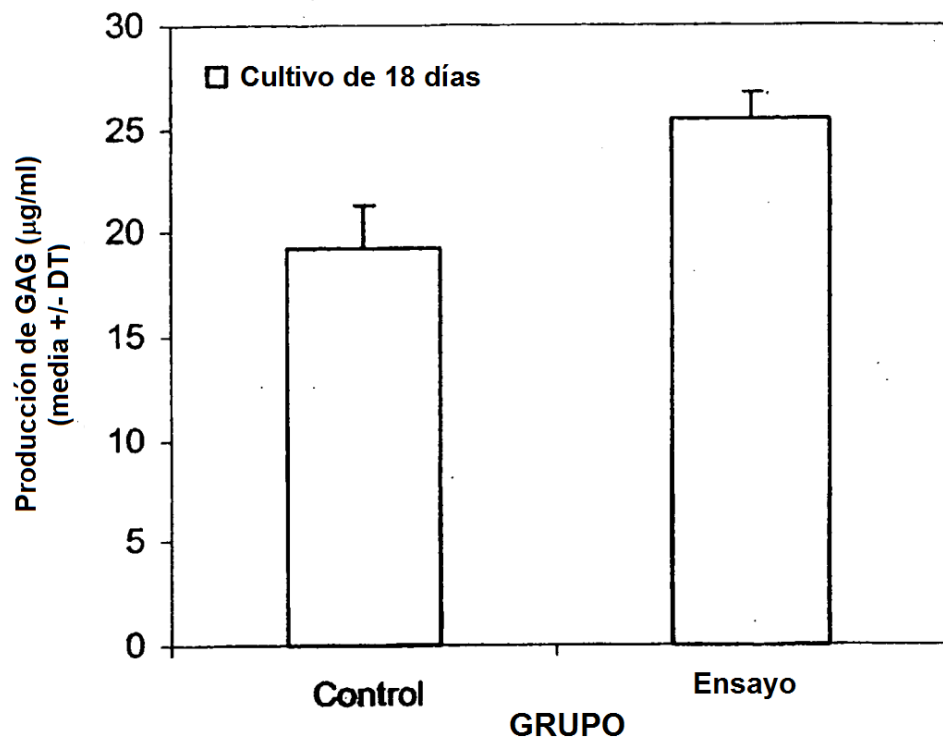


FIG. 4