

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 294**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12M 3/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2007 E 07758273 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2004810**

54 Título: **Procedimiento para crear sistemas de microvasos perfundibles**

30 Prioridad:

24.03.2006 US 388920

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

10.09.2013

73 Titular/es:

**NORTIS, INC. (100.0%)
1509 56TH AVENUE COURT NW
GIG HARBOR, WA 98335, US**

72 Inventor/es:

NEUMANN, THOMAS

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 422 294 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

Procedimiento para crear sistemas de microvasos perfundibles

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para el estudio de crecimiento vascular fisiológico y patológico, y crecimiento vascular en respuesta a factores angiogénicos o angioestáticos.

Antecedentes de la invención

10 Durante los procesos normales de crecimiento vascular (por ejemplo el ciclo menstrual, placentación, cambios de la adiposidad, reparación de heridas, inflamación), la creación de nuevos vasos sanguíneos está regulada y con el tiempo cesa. Resulta significativo que las desregulación del crecimiento vascular sea un elemento crítico de la patología. Por ejemplo, el crecimiento tumoral, retinopatías diabéticas, artritis y psoriasis implican proliferación

15 el crecimiento vascular, característica de individuos de edad avanzada, afecta a la curación de heridas y la revascularización de tejidos que se hacen isquémicos por traumatismo o enfermedad. Por lo tanto, un entendimiento de los mecanismos que dirigen el ensamblaje de nuevos vasos sanguíneos y de los procesos que inician y detienen el crecimiento vascular, son centrales para el desarrollo de estrategias para controlar la vascularización en enfermedad.

20 Durante el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (*angiogénesis*), surgen brotes de células endoteliales que revisten los lúmenes de capilares y vénulas postcapilares, las ramas más pequeñas del sistema vascular. La angiogénesis es un proceso multietapa complejo. Aunque existen muchos miles de estudios publicados sobre angiogénesis, los mecanismos celulares que median y regulan el crecimiento angiogénico y la morfogénesis no se entienden bien.

25 Los detalles del crecimiento angiogénico son difíciles de observar en "tiempo real" *in vivo* debido a la opacidad de la mayoría de los tejidos. Las secciones tisulares son difíciles de reconstruir en 3 dimensiones y no comunican la naturaleza dinámica del crecimiento vascular. Además, la región cerca de las puntas de los brotes angiogénicos, un área crítica del control de invasión y morfogénesis vascular, raramente se encuentra en secciones tisulares. Para superar las limitaciones de la histología convencional, se ha desarrollado una diversidad de "modelos" de angiogénesis *in vivo* e *in vitro*.

30 Modelos de angiogénesis *in vivo*: Para evitar la opacidad de tejidos vivos, los investigadores han observado angiogénesis a través de "ventanas" en animales vivos que incluyen las colas transparentes de forma natural de larvas de anfibios (Clark y Clark 1939), o cámaras de visión especializadas implantadas en las orejas de conejos (Clark y Clark 1939), piel de ratón (Algire, Chalkley y col. 1945) y abazones de hámster (Greenblatt y Shubi 1968) o desarrolladas a partir de bolsillos corneales de conejo (Gimbrone, Cotran y col. 1974) o membranas corioalantoides de pollo (Ausprunk, Knighton y col. 1974). A partir de estos estudios tempranos, principalmente descriptivos, llegó la validación del paradigma central de la quimiotaxis vascular inducida por tumor y el descubrimiento correspondiente

35 de moléculas derivadas de tumor difundibles que promueven el crecimiento vascular. Ensayos más recientes de angiogénesis *in vivo* miden el crecimiento vascular en esponjas poliméricas o tapones de proteínas de membrana basal gelificadas implantadas por vía subcutánea en roedores (Passaniti Taylor y col. 1992; Andrade, Machado y col. 1997; Akhtar, Dickerson y col. 2002; Koike, Vernon y col. 2003). A pesar de su elegancia, los enfoques *in vivo* se dificultan por: (1) la variación intraespecies en la respuesta angiogénica de un animal a otro; (2) la falta de traslación de los resultados de una especie a otra; (3) los altos costes de la compra y el mantenimiento de animales; (4) la desaprobación pública del uso de animales para fines de investigación; y (5) las complejidades encontradas en la cirugía animal y en la visualización y evaluación de resultados.

45 Modelos bidimensionales (2D) de angiogénesis *in vitro*: En un intento de entender las mecánicas moleculares de la angiogénesis, se cultivaron células endoteliales aisladas de grandes vasos en placas planas hasta que formaron monocapas de tipo pavimento confluentes, que simulaban los revestimientos endoteliales de vasos sanguíneos (Jaffe, Nachman y col. 1973; Gimbrone 1976). Aunque son útiles como modelos de respuestas proliferativas a lesión endotelial en grandes vasos sanguíneos (Gimbrone, Cotran y col. 1974; Fishman, Ryan y col. 1975; Madri y Stenn 1982; Madri y Pratt 1986; Jozaki, Marucha y col. 1990; Rosen, Meromsky y col. 1990), los cultivos monocapa de células endoteliales en sustratos rígidos no se organizan normalmente en tubos de tipo capilar en simulación de

50 angiogénesis. En 1980, sin embargo, después de cultivo a largo plazo exitoso de células endoteliales capilares (Folkman, Haudenschild y col. 1979), se indicó que cultivos de 20-40 días de células endoteliales capilares bovinas o humanas desarrollaron una red celular bidimensional sobre la monocapa celular concluyente, un proceso denominado "angiogénesis *in vitro*" (Folkman y Haudenschild 1980). Las células endoteliales de la red aparecían como "tubos" con "lúmenes" llenos de un material fibrilar/amorfo que se interpretó que era una red sintetizada de forma endógena de "mandriles" en los que se organizaban las células. Estudios posteriores presentaron formación de redes bidimensionales similares por células endoteliales de vasos grandes (Maciag, Kadish y col. 1982; Madri 1982; Feder, Marasa y col. 1983) y por células endoteliales sembradas sobre geles hidratados maleables de proteínas de membrana basal (por ejemplo gel Matrigel[®]) (Kubota, Kleinman y col. 1988).

Aunque los modelos bidimensionales de desarrollo vascular siguen usándose en la actualidad (el ensayo basado en Matrigel® (Kubota, Kleinman y col. 1988) está disponible en el mercado), dichos modelos carecen de las siguientes 5 características definitorias de la verdadera angiogénesis:

5 **1. Invasión** – Las células endoteliales en los modelos bidimensionales forman redes sobre la matriz extracelular y muestran poca propensión a excavar en la matriz extracelular (Vernon, Angello y col. 1992; Vernon, Lara y col. 1995).

2. Direccionalidad – En modelos bidimensionales, las redes de células endoteliales se forman *in vitro* de forma más o menos simultánea a través de un campo de células preposicionadas, mientras que la angiogénesis *in vivo* implica la invasión vectorial de la matriz extracelular por brotes filamentosos que se arborizan por múltiples niveles de ramificación.

10 **3. Polaridad correcta** – Aunque los modelos bidimensionales realizan tubos unicelulares que se asemejan notablemente a los capilares (Maciag, Kadish y col. 1982; Feder, Marasa y col. 1983; Sage y Vernon 1994), su polaridad es “de dentro a fuera”, es decir, depositan material de membrana basal en sus superficies lumbales y tienen sus superficies trombogénicas expuestas hacia fuera al medio de cultivo circundante (Maciag, Kadish y col. 1982; Feder, Marasa y col. 1983) a la inversa de la situación *in vivo*.

15 **4. Formación de lumen** – Las pruebas de que los modelos bidimensionales generan tubos de células endoteliales (EC) con lúmenes permeables son débiles. Normalmente, los tubos de células endoteliales tienen espacios “lumbales” que se llenan de matriz extracelular (bien exógena o bien sintetizada por las células) (Maciag, Kadish y col. 1982; Madri 1982; Feder, Marasa y col. 1983; Sage y Vernon 1994; Vernon, Lara y col. 1995). Cuando están presentes, los lúmenes permeables habitualmente aparecen como de tipo ranura o espacios cilíndricos estrechos limitados por paredes gruesas de citoplasma celular endotelial, bastante diferentes de los tubos de células endoteliales hinchados, de paredes finas que tipifican los capilares *in vivo*.

20 **5. Especificidad celular** – Las redes celulares en los modelos bidimensionales se generan por procedimientos mecánicos que pueden conseguirse mediante tipos celulares no EC (Vernon, Angello y col. 1992; Vernon, Lara y col. 1995). De hecho, la realización de modelos matemáticos ha mostrado que cualquier tipo celular adherente capaz de aplicar fuerzas de tracción a matriz extracelular bidimensional, maleable (bien sintetizada de forma endógena o bien proporcionada (por ejemplo, gel Matrigel®)) puede generar redes en condiciones óptimas (Manoussaki, Lubkin y col. 1996).

30 Modelos tridimensionales (3D) de angiogénesis *in vitro*: El reconocimiento de que la angiogénesis *in vivo* se produce dentro de una matriz extracelular tridimensional ha conducido a una diversidad de modelos en los que se induce el crecimiento dentro de geles tridimensionales de matriz extracelular *in vitro*. En un modelo tridimensional temprano las células endoteliales dispersadas dentro de geles de colágeno (Montesano, Orci y col. 1983) formaron redes de cordones y tubos (Elsdale y Bard 1972). Aunque los tubos de células endoteliales mostraron la polaridad correcta, faltaban las características de invasión y direccionalidad (las células endoteliales se preincluyeron y se dispersaron uniformemente en la matriz extracelular). No obstante, se ha mostrado que este enfoque es útil en estudios de formación del lumen (Davis y Camarillo 1996) y de respuestas de células endoteliales a factores de crecimiento (Madri, Pratt y col. 1988; Merwin, Anderson y col. 1990; Kuzuya y Kinsella 1994; Marx, Perlmutter y col. 1994; Davis y Camarillo 1996).

40 En un enfoque alternativo, secciones de 1 mm (anillos) de aorta de rata incluidas en coágulo de plasma tridimensional generaron tubos con ramificación y anastomosis (Nicosia, Tchao y col. 1982). Los brotes de los anillos aórticos mostraron invasión de tipo angiogénesis y direccionalidad además de polaridad. Se han usado modelos de explantes que utilizan anillos aórticos de ratas o segmentos microvasculares de ratones para estudiar la influencia de tumores, factores de crecimiento, diversos soportes de matriz extracelular y condiciones de envejecimiento en la angiogénesis (Nicosia, Tchao y col. 1983; Mori, Sadahira y col. 1988; Nicosia y Ottinetti 1990; Nicosia, Bonanno y col. 1992; Villaschi y Nicosia 1993; Nicosia, Bonanno y col. 1994; Nicosia, Nicosia y col. 1994; Nicosia y Tuszyński 1994; Hoying, Boswell y col. 1996; Arthur, Vernon y col. 1998).

50 Existen diversos modelos que inducen que crezcan células endoteliales purificadas (como monocapas o agregados) de forma invasiva en geles de matriz extracelular tridimensional subyacente o circundante (Montesano y Orci 1985; Pepper, Montesano y col. 1991; Montesano, Pepper y col. 1993; Nehls y Drenckhahn 1995; Nehls y Herrmann 1996; Vernon y Sage 1999; Vernon y Gooden 2002). Cada uno de estos modelos tiene limitaciones específicas que incluyen dificultad en la visualización de la formación de brotes, crecimiento limitado, un requisito de seccionamiento, o falta de eficacia con ciertos tipos de células endoteliales.

55 Wolverine y Gulec han desvelado un sistema de angiogénesis tridimensional (documento US 2002/0150879 A1) que implica incluir un fragmento de tejido tumoral en una matriz. La extensión de microvasos puede caracterizarse para ensayar el potencial angiogénico del tejido. Sin embargo, este enfoque no proporciona perfusión luminal de los microvasos.

60 Neumann (el inventor en la presente) y col. 2003, ha desvelado la posibilidad de crear microvasos perfundidos *in vitro* que pueden incluirse en un tejido artificial. Neumann y col. 2003 enseña el uso de sedal de nylon de 127 micrómetros como mandriles sostenidos por tubos retráctiles para hacer microvasos. Los vasos se realizaron a partir de células de músculo liso aórtico de rata incluidas en agar. Estos microvasos fueron de naturaleza exploratoria y no

adecuados para crear un injerto vascular humano.

Angiogénesis *in vitro*: un nuevo enfoque: Los modelos bidimensionales del crecimiento vascular *in vitro* no establecen las características definitorias de la angiogénesis enumeradas anteriormente, mientras que los modelos tridimensionales existentes reproducen algunas o la mayoría de las características. Resulta importante que ninguno de los modelos tridimensionales actualmente disponibles reconstruye un vaso sanguíneo parental que contenga un líquido circulatorio, presurizado, fluyente. En consecuencia, ninguno de los modelos tridimensionales *in vitro* permite el estudio de la contribución de la presión luminal y flujo al crecimiento vascular y morfogénesis.

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y supera las limitaciones de modelos existentes de angiogénesis combinando procedimientos demostrados para generar brotes invasivos, tubulares, microvasculares en matriz extracelular tridimensional (ECM) con nuevas metodologías para la fabricación de un vaso parental obtenido por ingeniería tisular que será la fuente de flujo luminal. Mediante el perfundido, los compuestos moduladores de angiogénesis pueden administrarse a la superficie luminal de las células endoteliales en la que se sabe que residen receptores diana específicos. La presencia de un flujo luminal de medio nutriente aumentará sustancialmente el tiempo de supervivencia de tubos capilares *in vitro*. El sistema de angiogénesis desvelado de la invención puede usarse para evaluar una diversidad de parámetros experimentales que incluyen hipoxia/hiperoxia, ensayo de compuestos bioactivos solubles específicos, uso de células modificadas genéticamente y suministro génico mediante transfección viral. El sistema permite el estudio de angiogénesis en relación con reparación de heridas, envejecimiento, cáncer y aterosclerosis. Resulta importante que pueda adaptarse un modelo siguiendo las enseñanzas de la presente invención para proporcionar sistemas vasculares completamente funcionales capaces de incorporarse en tejidos artificiales obtenidos por bioingeniería.

La presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas también proporciona nuevos y novedosos enfoques, incluyendo un diseño de colector para realizar microvasos, realizar microvasos a partir de células endoteliales, realizar vasos mayores (por ejemplo que tengan el tamaño de las arterias coronarias) y crear redes microvasculares.

Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para crear redes de microvasos perfundibles *in vitro*, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

crear al menos un vaso parental *in vitro* sembrando células endoteliales en y alrededor de al menos un mandril;
 incluir el al menos un vaso parental en una matriz;
 añadir estímulos angiogénicos para inducir que el al menos un vaso parental cree brotes en la matriz;
 extraer el al menos un mandril del al menos un vaso parental después de que el al menos un vaso parental cree brotes en la matriz; y someter el al menos un vaso parental y brotes a perfusión luminal.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para crear redes de microvasos perfundibles *in vitro*, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

crear al menos un vaso parental *in vitro* sembrando células endoteliales en y alrededor de al menos un mandril;
 incluir el al menos un vaso parental en una matriz y extraer el al menos un mandril, en el que el al menos un mandril se extrae del al menos un vaso parental antes o después de incluir el al menos un vaso parental en la matriz;
 añadir estímulos angiogénicos para provocar que el al menos un vaso parental forme brotes y someter el al menos un vaso parental y los brotes a perfusión luminal.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1A, FIGURA 1B y FIGURA 1C muestran esquemáticamente un ejemplo de creación de vasos parentales empleado de acuerdo con el procedimiento de la invención.
 La FIGURA 2A, FIGURA 2B, FIGURA 2C y FIGURA 2D muestran esquemáticamente un ejemplo de un procedimiento de retracción por calor conocido empleado de acuerdo con el procedimiento de la invención.
 La FIGURA 3A muestra esquemáticamente un diseño conocido para montar dispositivos de cultivo/perfusión empleados de acuerdo con el procedimiento de la invención.
 La FIGURA 3B muestra esquemáticamente un diseño usado en un procedimiento de fabricación para montar dispositivos de cultivo/perfusión empleados de acuerdo con el procedimiento de la invención.
 La FIGURA 4A y FIGURA 4B muestran esquemáticamente la creación de colectores para dispositivos de cultivo/perfusión empleados de acuerdo con el procedimiento de la invención.
 La FIGURA 5A, FIGURA 5B y FIGURA 5C muestran esquemáticamente un diseño alternativo para dispositivos de cultivo/perfusión microfabricados construidos de acuerdo con el procedimiento de la invención.

La FIGURA 6 muestra esquemáticamente un procedimiento de sembrado de células empleado de acuerdo con el procedimiento de la invención.

La FIGURA 7 muestra un esquema de una red capilar entre dos vasos parentales bioartificiales de acuerdo con el procedimiento de la invención.

5 La FIGURA 8A muestra una imagen *in vitro* de un ejemplo de una pluralidad de mandriles después de sembrar con células de músculo liso de acuerdo con el procedimiento de la invención.

La FIGURA 8B muestra un ejemplo de una placa de músculo perfundido realizada de acuerdo con el procedimiento de la invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

10 La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los ejemplos presentados en el presente documento son con el fin de fomentar un entendimiento de la invención. Los ejemplos son ilustrativos y la invención no se limita a las realizaciones a modo de ejemplo. El procedimiento de la presente invención es útil para el estudio de crecimiento vascular fisiológico y patológico, y crecimiento vascular en respuesta a factores angiogénicos o angioestáticos. Otras aplicaciones útiles son para procedimientos que evalúan el potencial angiogénico de tejidos cancerosos y la respuesta a fármacos antiangiogénicos. Adicionalmente, el procedimiento de la invención puede usarse para construir diversos dispositivos de curación de heridas y para vascularización de construcciones obtenidas por ingeniería tisular.

15 En un ejemplo se desvela un procedimiento y dispositivo para la creación de redes microvasculares tridimensionales perfundibles. Como se usa en el presente documento "EC" se refiere a células endoteliales, "SMC" se refiere a células de músculo liso y "CAS" se refiere a sustitutos de arteria coronaria.

20 También se desvelan en el presente documento pero no se reivindican dispositivos para el cultivo y perfusión de redes microvasculares que generalmente consisten en una cámara que mantiene uno o más mandriles en el centro (como se muestra mejor en la FIGURA 1). Las cámaras pueden fabricarse de cualquier material biocompatible y por varias técnicas, por ejemplo, intercalando marcos cortados por láser. Los mandriles se ensamblan dentro de la cámara de tal modo que sean retráctiles. Esto puede conseguirse ajustando los extremos de los mandriles a tubos, como, por ejemplo, por retracción por calor (como se demuestra en la FIGURA 2). El diámetro de los mandriles depende del calibre de vaso deseado. La preparación puede modificarse para acomodar vasos individuales, dos vasos, o hasta series completas de vasos en 2 dimensiones o 3 dimensiones. Los mandriles pueden ser de diversos materiales, tales como fibras de polímero, fibra de vidrio, alambres y similares.

25 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Brevemente, se crean microvasos sembrando células en los mandriles, estimulando las células para que se multipliquen alrededor de los mandriles, y extrayendo los mandriles cuando las células han formado paredes vasculares. Los vasos se incluyen después en una matriz. Dependiendo de las condiciones de cultivo, la composición de la matriz, y la presencia de estímulos angiogénicos (por ejemplo factores de crecimiento), los vasos parentales crecerán hacia la matriz circundante. Los brotes se anastomizarán entre sí y conduciendo de este modo a la formación de redes capilares. Después de la retirada de los mandriles, los dispositivos se conectan a un sistema de perfusión y los vasos se someten a flujo de líquido luminal.

30 Con referencia ahora a la FIGURA 1A, FIGURA 1B y FIGURA 1C, se muestra un ejemplo esquemático de creación de vasos parentales empleado por el procedimiento de la invención. La FIGURA 1A muestra células endoteliales 1 en un medio de crecimiento de cultivo 100, sembradas en el mandril 2 mantenido por los tubos retráctiles 4 en un cuerpo de dispositivo 3. La FIGURA 1B muestra que las células 1 se han multiplicado y han formado una capa circular en forma de manga celular 102. La FIGURA 1C muestra la manga celular después de la extracción del mandril 2 en un gel de matriz extracelular (ECM) 110 que se perfunde con el medio de crecimiento de cultivo 100. La invención como se define en las realizaciones adjuntas comprende la obtención por ingeniería de estructuras vasculares bioartificiales perfundibles para aplicaciones de ingeniería tisular y modelos de investigación. El principio general de la invención implica el cultivo de células en capas alrededor de mandriles desmontables que se ajustan estrechamente en tubos de pared fina u otros equipamientos. Una vez que las capas celulares han alcanzado un grosor de pared deseado, los mandriles se retiran y los vasos bioartificiales creados de este modo (BAV) pueden perfundirse con medio de cultivo, sangre, sustitutos de sangre y otros fluidos mediante la ayuda de un sistema de perfusión. El procedimiento de la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas posibilita la producción de vasos sanguíneos creados a petición o fabricados en masa, modelos de angiogénesis *in vitro* perfundidos, dispositivos de curación de heridas, componentes tisulares, órganos y tejidos completos así como modelos de investigación.

Fabricación de dispositivos de cultivo/perfusión

35 Haciendo referencia ahora a la FIGURA 2A, FIGURA 2B, FIGURA 2C y FIGURA 2D se muestra un ejemplo esquemático de un procedimiento de retracción por calor conocido usado en una realización del procedimiento de la invención. Como se muestra específicamente en la FIGURA 2A cada dispositivo de cultivo/perfusión (CPD) puede comprender uno o más mandriles 2 mantenidos por un marco de soporte 12. Los mandriles 2 del diámetro del calibre de vaso deseado se ajustan con sus extremos estrechamente en segmentos de tubos retráctiles de uso médico 4. Los mandriles 2 pueden comprender fibras biocompatibles (por ejemplo polímero, vidrio), alambres o

equivalentes que tengan un diámetro de varios micrómetros hasta varios milímetros dependiendo del tamaño del vaso que se emule.

Como se muestra en el dibujo más detallado de la FIGURA 2B, una parte central 14 de cada segmento de tubos retráctiles 4 se retrae por calor alrededor de uno de los mandriles 2. Posteriormente, como se muestra específicamente en la FIGURA 2C, el mandril 2 se retrae y se corta el tubo. La FIGURA 2D muestra la situación después del reposicionamiento del mandril de modo que ambos extremos del mandril están incluidos en el segmento de tubo retráctil ahora cortado y separado 4. Los marcos 12 pueden fabricarse usando diversos materiales y técnicas. La preparación puede modificarse para acomodar vasos bioartificiales individuales o series de vasos bioartificiales. De forma similar, estratificando varios planos de series de mandriles, puede generarse un tejido perfundible, grueso, con redes vasculares.

Mecanizado de cámaras de perfusión

Haciendo referencia ahora a la FIGURA 3A se muestra una preparación conocida para la perfusión de varios ensamblajes de mandril/tubo retráctil 11. Un marco 20 puede cortarse provechosamente a partir de materiales de policarbonato o equivalentes. Pueden incluirse cámaras de distribución 30 en el diseño, lo que posibilita la perfusión simultánea de muchos vasos bioartificiales. Los extremos de un conjunto de hebras que comprenden los mandriles 2 se reúnen en un tubo de silicio 23.

Corte con láser de marcos de Mylar

Haciendo referencia ahora a la FIGURA 3B, se muestra de forma esquemática un nuevo diseño usado en un procedimiento de fabricación para montar dispositivos de cultivo/perfusión empleados de acuerdo con el procedimiento de la invención. Puede crearse provechosamente un diseño de vasos individual, CPD 70, intercalando un mandril 2 mantenido por tubos retráctiles por calor 4 entre dos marcos de Mylar® cortados con láser 22. Puede usarse provechosamente un colector de epoxi cilíndrico 21, construido como se detalla posteriormente, para mantener el ensamblaje de mandril/tubos retráctiles 11.

Los ensamblajes de mandril/tubos retráctiles pueden intercalarse entre dos marcos de una película de poliéster o similares, tal como Mylar®, con extremos adhesivos apretados juntos de modo que cada mandril esté suspendido en la ventana del marco 76 por dos elementos de tubos retráctiles 4' en cada extremo. Los dos segmentos de tubos retráctiles 4' están estabilizados y reforzados por la inclusión de al menos un alambre estabilizador fino 26 en el marco 22 y por encapsulación en colectores epoxi cilíndricos que están puestos alrededor del tubo retráctil y el al menos un alambre estabilizador fino 26 mediante el uso de un molde de tubo de silicona. Los dos segmentos de tubo retráctil 4' se convertirán con el tiempo en los orificios de entrada y salida para el CPD70.

Haciendo referencia ahora a la FIGURA 4A y la FIGURA 4B, se muestra esquemáticamente un procedimiento para la creación de colectores para los dispositivos de acuerdo con el procedimiento de la invención. La FIGURA 4A muestra particularmente una pluralidad de ensamblajes de tubos retráctiles/mandril 11 que atraviesan una manga de, por ejemplo, tubo de silicona 50. Se inyecta un pegamento de epoxi 40 para llenar el tubo de silicona 50 y se permite que se endurezca.

La FIGURA 4B muestra particularmente la condición después de que el pegamento de epoxi 40 se ha endurecido y el tubo de silicona 50 se rasga y se retira. Queda un vástago de epoxi endurecido 44. El vástago de epoxi 44 se corta después de haberse retraído los mandriles detrás del punto de corte dejando los canales 42 creados por el tubo retráctil. Los extremos 46 de muchos tubos retráctiles pueden integrarse para formar un colector 21. La acumulación de CPD individuales o ensamblajes de marcos de CPD puede usarse para crear conjuntos de recipientes tridimensionales.

Procedimientos alternativos

Haciendo referencia ahora a la FIGURA 5A, FIGURA 5D y FIGURA 5C se muestra esquemáticamente un diseño alternativo para dispositivos de cultivo/perfusión microfabricados de acuerdo con el procedimiento de la invención. La FIGURA 5A muestra particularmente un conjunto de mandriles 2 introducido a través de perforaciones pequeñas 54 en un marco en el que las perforaciones tienen mangas 56, que sustituyen a los tubos retráctiles. La FIGURA 5B muestra particularmente un CPD antes de la siembra de células que incluye un conjunto de mandriles 2 montados en un pared de marco 52.

La FIGURA 5C muestra particularmente un ejemplo alternativo de un dispositivo de cultivo/perfusión con vasos 62 en el que pueden unirse colectores microfabricados 64 a las mangas 56 por fuera del marco 52. Los vasos 62 se dejan crecer sobre los mandriles como se muestra en el presente documento y permanecen después de que se retiren los mandriles. Pueden usarse procedimientos de microfabricación, tales como micromoldeado, para la producción en masa de dichos ensamblajes de marco de CPD.

Creación de vasos y perfusión

Haciendo referencia ahora a la FIGURA 6 se muestra esquemáticamente un procedimiento de sembrado de células

- de acuerdo con el procedimiento de la invención. Para preparar los CPD 70 para siembra de células, estos en primer lugar se limpian y después se esterilizan por UV. En condiciones estériles, los CPD se fijan a una superficie, por ejemplo el fondo de la placa de Petri 72. La ventana interna 76 (como se muestra en la FIGURA 3B) del ensamblaje de marco de GPD 70 se llena después con una solución que contiene una proteína unión, tal como laminina 1.
- 5 Pueden usarse uno o más espaciadores 77 según sea necesario. Después de un periodo de incubación, se retira la solución que contiene proteína de unión, y se transfiere después una suspensión de células endoteliales en medio de cultivo a la ventana 76 del CPD 70. También se desvela en el presente documento pero no se reivindica un procedimiento en el que se usa otro tipo celular deseado (tal como células de músculo liso) en medio de cultivo celular y se transfieren a la ventana 76 del CPD 70.
- 10 La siembra de células puede realizarse llenando con un volumen de suspensión celular la ventana 76 y volteando el ensamblaje del marco de CPD 70 de abajo arriba, creando de este modo una gota colgante 80. Durante un periodo de incubación de aproximadamente 45 minutos, se unirá un gran número de células a los ensamblajes de mandril/tubos retráctiles dentro del ensamblaje de marco de CPD. Las células excesivas se hundirán en la punta de la gota colgante y pueden recogerse y descartarse fácilmente. La placa de Petri, que contiene uno o más
- 15 ensamblajes de marco de CPD, se devuelve después a una posición erguida, se llena con el medio de cultivo hasta que los ensamblajes de marco de CPD están inundados y se incuban. Las condiciones de incubación en un ejemplo fueron en un ambiente de CO₂ al 5 % a 37 °C. Las células unidas a los ensamblajes de mandril/tubos retráctiles se propagarán y se multiplicarán, formando monocapas concéntricas (por ejemplo células endoteliales) o multicapas de 150 μm o más de grosor (por ejemplo células de músculo liso).
- 20 En el grosor o configuración de pared deseado se extraen los mandriles, creando de este modo tubos celulares huecos. Las paredes más finas pueden protegerse de ruptura poniendo un gel tal como, por ejemplo, agarosa, colágeno, un gel de proteínas de membrana basal o similares, alrededor de las mangas celulares antes de la extracción del mandril. Los colectores de los ensamblajes de marco de CPD se conectan después a un sistema de perfusión y se perfunden con el fluido elegido tal como medio de cultivo.
- 25 También se desvela en el presente documento pero no se reivindica un procedimiento para la creación de vasos "parentales" endoteliales a partir de células endoteliales humanas (HUVEC) que comprende las etapas en las que:
- El dispositivo de cultivo en primer lugar se limpia y después se esteriliza por exposición a UV durante 30 minutos de cada lado. En condiciones estériles el dispositivo se fija al fondo de una placa de Petri con tiras estériles.
- 30 La ventana interna del dispositivo se llena después con una solución de proteína de unión de laminina 1 (pueden usarse en su lugar otras proteínas de unión, tales como fibronectina, fibrina o gelatina).
- Después de incubación durante una noche, se retira la solución que contiene proteína de unión y se transfiere después una suspensión de células endoteliales vasculares humanas en medio de cultivo a la ventana del dispositivo.
- 35 La placa de Petri se invierte después de arriba abajo, creando de este modo una gota colgante de suspensión de medio celular en la ventana del dispositivo. Después de un periodo de incubación de 45 minutos en un incubador de cultivo celular (CO₂ 5 %, 37 °C) se unirá un gran número de células a los ensamblajes de mandril/tubos retráctiles dentro de los dispositivos.
- 40 La placa de Petri se lleva después a la posición erguida, y se llena con medio de cultivo para células endoteliales vasculares humanas hasta que el dispositivo está sumergido.
- Las células no unidas a los mandriles se separarán flotando y pueden aspirarse y descartarse.
- La placa de Petri se sitúa después en un incubador (CO₂ al 5 %, 37 °C). Las células unidas a los mandriles se propagarán y multiplicarán, formando monocapas concéntricas de células endoteliales vasculares humanas.
- 45 El medio de cultivo se retira después de la placa de Petri. Se llena con una solución de colágeno la ventana del dispositivo de cultivo, y se permite que solidifique, incluyendo de este modo el mandril con la capa celular.
- Las células endoteliales vasculares humanas formarán brotes en el gel de colágeno. Después se extrae lentamente el mandril, dejando detrás un microvaso "parental" perfundible de células endoteliales vasculares humanas.
- Los colectores del dispositivo se conectan después con un sistema de perfusión y se perfunden con medio de cultivo de células endoteliales vasculares humanas.
- 50 *Sistema de perfusión*
- Los CPD pueden unirse a sistemas de perfusión en modo lineal o circulatorio. Puede crearse un montaje lineal con un sistema de flujo por gravedad, o una bomba de jeringa construida a petición o disponible en el mercado. Las jeringas se cargan con el medio de perfusión, se montan en la bomba de jeringa y se conectan a los extremos corriente arriba de los CPD mediante tubos impermeables a gases. Los CPD pueden almacenarse en un incubador

en condiciones estériles o puede establecerse un ambiente de cultivo celular estéril dentro del CPD. El colector corriente abajo de los CPD se conecta a depósitos finales que recogen el perfundido. Puede construirse un sistema circulatorio usando una bomba peristáltica. Tanto el sistema lineal como el circulatorio pueden equiparse con dispositivos para intercambio de gases. Se miden con sensores la concentración de gas, presión de perfusión, flujo, temperatura y la concentración de nutrientes y productos secundarios metabólicos. Los datos recogidos pueden suministrarse a un bucle de retroalimentación, posibilitando un control estrecho de los parámetros deseados.

Aplicaciones específicas

Modelos para investigación relacionada con angiogénesis

Haciendo referencia ahora a la FIGURA 7, la FIGURA 7 muestra un esquema de una red capilar entre dos vasos parentales bioartificiales 200, 202 de acuerdo con el procedimiento de la invención. El perfundido de fluidos 204 se desvía a través de los capilares 206 reduciendo el flujo (f) al vaso parental "venoso" 202, y aumentando la resistencia (R) en el vaso parental "arterial" 200. En consecuencia, el perfundido 204 se dirige desde el vaso con mayor presión al vaso con menor presión, estimulando el flujo sanguíneo natural del extremo arterial al extremo venoso del lecho capilar.

También puede usarse el procedimiento de mandril para el desarrollo de modelos para investigación de angiogénesis, según se necesite para los ensayos farmacéuticos y la investigación en reparación de heridas, envejecimiento y enfermedades como cáncer, diabetes, artritis y psoriasis. Usando solamente células endoteliales, o combinaciones de células endoteliales, células de músculo liso y pericitos, pueden cultivarse microvasos bioartificiales parentales (BMV) alrededor de mandriles de diámetro micrométrico e incluirse en un gel de soporte de matriz extracelular. Después se extraerán los mandriles, dejando detrás los tubos celulares endoteliales permeables dentro del gel de matriz extracelular 210 (gel de colágeno, matrices de membrana basal (BMM), u otros). La extracción puede realizarse manualmente, o con la ayuda de un dispositivo automático, y con velocidades que varían de extremadamente lenta a extremadamente rápida. Otras variaciones pueden incluir la extracción del mandril de microvasos bioartificiales en un estado congelado, revestimiento de los mandriles con un polímero termosensible, o tirando de uno de los extremos del mandril, y estrechándolos de este modo hasta su ruptura.

El crecimiento de los vasos parentales en el gel circundante 210 se inducirá por compuestos, tales como factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y forbol 12-miristato-13-acetato (PMA), que se añaden al gel y/o perfundido (por ejemplo medio de cultivo).

Pueden crearse redes capilares complejas 222 estableciendo una diferencia de presión entre dos microvasos bioartificiales parentales adyacentes, imitando de este modo el flujo sanguíneo arterial y venoso. El flujo del fluido se redirigirá después desde el microvaso bioartificial "arterial" a través de los brotes interconectados al microvaso bioartificial "venoso".

El perfundido puede comprender provechosamente medio de cultivo celular oxigenado, sin suero y sustancias angiogénicas o angioestáticas. En otro ejemplo el perfundido puede ser un medio de cultivo celular oxigenado, complementado con suero y/o compuestos que influyen en la angiogénesis. En otra realización a modo de ejemplo más el perfundido puede ser una solución salina fisiológica oxigenada. En otro ejemplo el perfundido puede incluir sangre oxigenada, componentes de la sangre o sustitutos de la sangre. En otra realización a modo de ejemplo más el perfundido puede no ser oxigenado, y se consigue oxigenación del sistema por difusión a través de la matriz. En otra realización a modo de ejemplo más pueden añadirse compuestos angiogénicos o angioestáticos a un perfundido.

En una realización a modo de ejemplo, se añaden compuestos angiogénicos y angioestáticos o similares a la matriz. En otra realización a modo de ejemplo más las células comprenden células modificadas genéticamente que liberan productos a un perfundido o a la matriz. En otra realización a modo de ejemplo más la matriz puede comprender provechosamente fibrina, colágeno y gelatina. Un tipo de matriz útil es gel Matrigel®. En otra realización a modo de ejemplo la matriz puede comprender agar, agarosa, alginato o gel de sílice.

Los procedimientos de la invención comprenden crear al menos un vaso parental *in vitro* sembrando células endoteliales en y alrededor de al menos un mandril. También se desvelan pero no se reivindican en el presente documento procedimientos en los que las células se seleccionan del grupo que consiste en células de músculo liso, pericitos, células humanas, células animales, células vegetales, células madre y células modificadas genéticamente. La matriz puede poblarse con células seleccionadas del grupo que consiste en células humanas, células animales y células vegetales, bien dispersadas a lo largo de la matriz o concentradas localmente. En algunos casos un fragmento de tejido sano o enfermo, tal como tejido canceroso se incluye en la matriz.

El crecimiento de vasos parentales puede estudiarse microscópicamente *in vitro*, en material de sección o en preparaciones montadas completas. La perfusión de los microvasos bioartificiales con soluciones fluorescentes (por ejemplo dextranos fluorescentes) ayuda al análisis del diámetro del brote, la permeabilidad de los lúmenes del brote, y el grado de anastomización. Puede realizarse reconstrucción tridimensional de las morfologías del brote por acumulación en el eje z de imágenes de epifluorescencia tomadas por un microscopio confocal. La síntesis de una matriz de membrana basal pericelular por brotes 220 puede supervisarse en montajes completos y en secciones

histológicas (parafina) mediante inmunomarcaje con antilaminina y anticuerpos primarios de colágeno de tipo IV y anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa o fluorescentes.

5 En brotes compuestos de EC/SMC, las relaciones espaciales entre los dos tipos celulares pueden examinarse marcando células endoteliales con un anticuerpo monoclonal (MAb) conjugado con FITC para CD31 humano (clon P2B1 - Chemicon) o FITC-UEA 1 aglutinina, un marcador específico para células endoteliales humanas. Las células de músculo liso pueden marcarse con un MAb para actina SM-alfa humana seguido de anticuerpos secundarios anti-ratón RITC. Pueden obtenerse detalles de la estructura luminal e interacción entre células endoteliales y células de músculo liso a partir de secciones de parafina marcadas con los reactivos anteriormente mencionados.

10 Los procedimientos de fabricación descritos son la base de la producción en masa comercial de dispositivos de angiogénesis con una alta capacidad de repetición. Con conservación adecuada (por ejemplo criopreservación), podrían ponerse a disposición de investigadores en comercio vasos parentales precultivados o redes capilares completas.

Sustitutos de arterias coronarias

15 Para la creación de sustitutos de arterias coronarias, se usan mandriles con un diámetro exterior seleccionado para producir un sustituto de arteria coronaria que tienen un lumen de vaso con un diámetro interno de aproximadamente 4 mm a 5,5 mm. Como alternativa, el mandril puede ser un tubo hueco que se perfunde y es suficientemente permeable para permitir el intercambio de nutrientes y gases durante el periodo de crecimiento del sustituto de arteria coronaria. En un procedimiento desvelado en el presente documento pero no reivindicado, los sustitutos de arterias coronarias pueden cultivarse solamente a partir de células de músculo liso, presentando de este modo una estructura análoga a la capa media de los vasos sanguíneos, o realizarse como estructuras compuestas de dos o tres tipos celulares.

25 También se describe en el presente documento pero no se reivindica un procedimiento en el que se siembran células de músculo liso en los mandriles y se cultivan en capas circulares de 300-400 µm. Para acelerar la creación de sustitutos de arterias coronarias, el fenotipo de SMD puede manipularse de tal modo que las células se pongan en un fenotipo altamente proliferativo durante la fase de crecimiento inicial, y después se cambian a un estado diferenciado después de que la pared del vaso haya alcanzado el grosor deseado. El cambio de fenotipo provocará que las células de músculo liso ralenticen drásticamente su velocidad de crecimiento e inducirá la promoción de proteínas de matriz extracelular, tales como colágeno y elastina, que son esenciales para las propiedades mecánicas correctas de los vasos. El cambio de fenotipo puede conseguirse controlando la expresión de ciertos genes. Por ejemplo, con la ayuda de un promotor sensible a tetraciclina, la expresión génica (por ejemplo de elastina) puede suprimirse hasta que la pared vascular haya alcanzado el grosor deseado. La omisión de tetraciclina del medio de cultivo activará después el gen insertado. La sobreexpresión de elastina, por ejemplo, inhibirá la proliferación celular adicional y ejercerá funciones estructurales y de señalización dentro de la pared vascular. Puede usarse condicionamiento mecánico, por ejemplo flujo pulsátil para fortalecer los sustitutos de arterias coronarias e inducir el alineamiento fisiológico de las células. Pueden usarse potencialmente también otros "cambios de fenotipo" externos o internos.

40 Las células endoteliales pueden sembrarse en las mangas de SMC directamente después de la retirada del mandril o después del acondicionamiento y restructuración de las células de músculo liso. Puede realizarse siembra de células endoteliales por infusión de una suspensión de células endoteliales en la manga de SMC. El flujo se detiene después durante un periodo de tiempo para permitir la unión apropiada de las células endoteliales. Si es necesario, los vasos pueden rotarse, o invertirse repetidas veces para facilitar una distribución homogénea de las células endoteliales.

45 Como alternativa, las células endoteliales pueden sembrarse en primer lugar en el mandril. En ese caso las células de músculo liso se siembran en una capa celular endotelial confluyente. Para este procedimiento, será necesario evitar que las células endoteliales migren hacia la periferia del sustituto de arteria coronaria, que es más rica en oxígeno y nutrientes.

Si se desea, la siembra de células de fibroblasto en el exterior de las mangas de SMC puede crear una capa adventicia.

50 Las células para crear sustitutos de arterias coronarias pueden derivar de material autólogo, heterólogo o xenogénico. Las células pueden ser células madre, células precursoras o células diferenciadas. Las células pueden modificarse genéticamente para conseguir un fenotipo específico o para reducir la respuesta inmunitaria del organismo huésped.

55 El procedimiento de la presente invención proporciona la opción de producir en masa sustitutos de vasos comerciales o sustitutos de vasos que se diseñan a petición del cliente para el receptor. El procedimiento de la presente invención también es adecuado para el desarrollo de modelos para ingeniería tisular de sustitutos de arterias coronarias, para investigación en aterogénesis, arteriogénesis, para investigación en la interacción de diferentes tipos celulares vasculares entre sí y con componentes de la matriz extracelular, para estudios sobre los efectos del óxido nítrico y para el estudio de diversos productos farmacéuticos.

Vasos sanguíneos y linfáticos de diferente tamaño o tipo

El procedimiento de la presente invención puede usarse para crear vasos sanguíneos de diámetro y tipo distinto de las arterias coronarias. El cambio del diámetro del mandril variará el diámetro del vaso. El tipo de vaso (arterial, venoso, linfático) puede variarse con el fenotipo de las células y/o el punto temporal cuando se inhibe la proliferación de las células. Las venas, por ejemplo, contienen solamente una capa de células de músculo liso pequeña.

Otros tejidos de tipo tubular

También se desvelan en el presente documento pero no se reivindican procedimientos para la obtención por ingeniería de otros tejidos tubulares, tales como conducto biliar, conducto lacrimal, tubo faringotimpánico oviducto, vasos deferentes, uréter, uretra, etc. Dicho procedimiento puede demostrar ser útil para la generación de conductos nerviosos de diferentes tipos celulares, incluyendo células de la glía, para orientación del crecimiento y reparación neuronal.

Sistemas de BAV para tejidos obtenidos por ingeniería

También se desvelan en el presente documento pero no se reivindican procedimientos para la obtención por ingeniería de tejidos y órganos usando conjuntos de mandriles desmontables como un armazón. Las células del tejido/órgano deseado (músculo, hígado, riñón, pulmón, piel, etc.) se siembran en los mandriles revestidos de proteína de unión. Estos mandriles pueden realizarse a partir de fibras sólidas o alambres, o, como alternativa, a partir de tubos permeables pefundibles, tales como celulosa. Los mandriles se separan entre sí con una separación precisa que permite que las mangas de células individuales se unan. Con este procedimiento, pueden formarse láminas o bloques de tejido. Los mandriles se extraen después (o se retiran de forma diferente), y el tejido bioartificial se perfunde de forma interna con la ayuda de un sistema de perfusión.

Dispositivo de curación de heridas

Pueden usarse sistemas de vasos bioartificiales prefabricados para ayudar en la curación de heridas, tal como para úlceras crónicas en pacientes diabéticos. Las redes capilares bioartificiales podrían incluirse en parches de materiales de soporte (por ejemplo de geles de matriz extracelular, enriquecidos con factores de crecimiento angiogénicos), y situarse en la herida. Perfundido de forma autónoma con soluciones de nutrientes oxigenadas, el vaso bioartificial facilitaría el crecimiento de la vasculatura y piel donante. Como alternativa, dicho parche de vaso bioartificial podría intercalarse entre la herida y un injerto cutáneo, y facilitar el crecimiento del injerto.

Dispositivo de terapia génica

Los vasos bioartificiales podría usarse para dispositivos de suministro farmacológico implantables. Las células, tomadas de un paciente, podrían modificarse genéticamente *in vitro* para producir una cierta proteína (hormona, enzima, etc.). Estas células podrían después cultivarse en vasos bioartificiales o redes vasculares, usando el procedimiento anteriormente mencionado. Reimplantadas en el huésped, las células continúan produciendo la sustancia diana y la liberan localmente de forma sistémica.

Tejidos y órganos artificiales

Pueden usarse redes vasculares obtenidas por ingeniería tisular, como se ha descrito anteriormente, para la creación de tejidos, o incluso órganos completos. Un enfoque es la creación de uno o más vasos parentales perfundidos *in vitro*. Se siembran células del estroma del tejido u órgano deseado alrededor de los vasos parentales, por ejemplo, en un gel. Se proporcionan a las células del estroma nutrientes y oxígeno mediante los vasos parentales. Cuando las células del estroma se multiplican, aumenta la necesidad de nutrientes y oxígeno. Las células liberan factores angiogénicos y estimulan que crezcan los vasos. El sistema vascular crece a la misma velocidad que crece el tejido, muy similar al crecimiento natural. Por lo tanto, este sistema también sería un buen modelo para estudios de la biología del desarrollo.

Otro enfoque utiliza conjuntos paralelos de mandriles como un armazón para células del estroma. A medida que se multiplican las células del estroma, se forman capas celulares alrededor de los mandriles. Con el tiempo el espacio entre todos los mandriles se llena de células del estroma, dando como resultado una lámina de tejido. Tras la retirada de los mandriles, el tejido puede perfundirse a través de los canales, dejados atrás por los mandriles. Estos canales pueden endotelializarse mediante siembra luminal. Este enfoque no se limita a dos dimensiones. Pueden apilarse varias láminas o pueden usarse armazones tridimensionales. El inventor en el presente documento ha usado conjuntos bidimensionales así como conjuntos tridimensionales para la obtención por ingeniería de tejido muscular.

En otro enfoque más, podrían crearse de forma independiente capas de tejido y capas de redes vasculares, y después apilarse de forma intermitente. Todos estos enfoques pueden producir modelos sencillos con uno o dos tipos celulares, o en su lugar construcciones complejas compuestas de varios tipos celulares.

Tras la implantación, los tejidos y órganos, obtenidos por ingeniería con estos procedimientos, podrían conectarse

directamente al torrente sanguíneo, o mantenerse perfundidos por un sistema de perfusión hasta que la vasculatura del huésped haya crecido en el injerto.

Ejemplo de construcción de músculo obtenido por ingeniería tisular perfundida (no es un ejemplo de la invención)

5 Haciendo referencia ahora a la FIGURA 8A, se muestra una imagen *in vitro* de un ejemplo de una pluralidad de mandriles después de sembrar células de músculo liso de acuerdo con el procedimiento de la invención. Se intercala una pluralidad de unidades de mandril y tubo retráctil M en un marco de Mylar[®]. La distancia entre los mandriles M se ajustó a aproximadamente 100 μm . Los extremos de todos los segmentos de tubos retráctiles se combinaron en un colector corriente arriba y uno corriente abajo (no mostrado). El marco de Mylar se esterilizó, se revistió con laminina y se sembró con una suspensión de 5×10^5 células de músculo liso aórtico de rata SM (RASMC)/ml. Las células SM se unieron a cada mandril individual M y se multiplicaron, formando de este modo capas circulares. Después de 10 días, las capas individuales se habían fusionado y dieron como resultado una lámina gruesa o placa de células de músculo liso. Después de 7 días adicionales en medio de cultivo, el medio se complementó con heparina 50 U/ml durante otros 7 días. Después se extrajeron todos los mandriles, y el tejido se perfundió con medio de heparina a una velocidad de 10 ml/día. La cámara de perfusión se mantuvo fijada al fondo de una placa de Petri de 100 mm llena de medio de heparina. La placa de SMC se perfundió durante 11 días. Durante ese tiempo, los canales CH permanecieron funcionales y permanecieron claramente visibles *in vitro* (como se muestra mejor en la Figura 8B).

20 Haciendo referencia ahora a la FIGURA 8B, se muestra un ejemplo de una placa de músculo perfundido MP. Se muestra fluido perfundido a través de los extremos de los tubos (T) a los canales (CH) dejados por los mandriles extraídos.

25 La invención se ha descrito en el presente documento en detalle considerable para cumplir con los Estatutos de Patentes y para proporcionar a los expertos en la materia la información necesaria para aplicar los nuevos principios de la presente invención, y para construir y usar dichos componentes a modo de ejemplo y especializados según se requiera.

Referencias

- Akhtar N, Dickerson EB, Auerbach R. 2002. The sponge/Matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis* 5: 75-80.
- Algire GH, Chalkley HW, Legallais FY, Park HD. 1945. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* 6: 73-85.
- 30 Andrade SP, Machado RD, Teixeira AS, Belo AV, Tarso AM, Beraldo WT. 1997. Sponge-induced angiogenesis in mice and the pharmacological reactivity of the neovasculature quantitated by a fluorimetric method. *Microvasc Res* 54: 253-261.
- Arthur WT, Vernon RB, Sage EH, Reed MJ. 1998. Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice. *Microvasc Res* 55: 260-270.
- 35 Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J. 1974. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev Biol* 38: 237-248.
- Clark ER, Clark EL. 1939. Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammal. *Am J Anat* 64: 251-301.
- Davis GE, Camarillo CW. 1996. An alpha 2 beta 1 integrin-dependent pinocytotic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Exp Cell Res* 224: 39-51.
- Elsdale T, Bard J. 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 54: 626-637.
- Feder J, Marasa JC, Olander JV. 1983. The formation of capillary-like tubes by calf aortic endothelial cells grown in vitro. *J Cell Physiol* 116: 1-6.
- 45 Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. 1975. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. *Lab Invest* 32: 339-351.
- Folkman J, Haudenschild C. 1980. Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551-556.
- Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR. 1979. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 5217-5221.
- 50 Gimbrone MA, Jr. 1976. Culture of vascular endothelium. In: *Prog Hemost Thromb*. p 1-28.
- Gimbrone MA, Jr., Cotran RS, Folkman J. 1974a. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 60: 673-684.
- Gimbrone MA, Jr., Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. 1974b. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 52: 413-427.
- 55 Greenblatt M, Shubi P. 1968. Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J Natl Cancer Inst* 41:1 11-124.
- Hoying JB, Boswell CA, Williams SK. 1996. Angiogenic potential of microvessel fragments established in three-dimensional collagen gels. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32: 409-419.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756.
- 60 Jozaki K, Marucha PT, Despins AW, Kreutzer DL. 1990. An in vitro model of cell migration: evaluation of vascular

- endothelial cell migration. *Anal Biochem* 190:3 9-47.
- Koike T, Vernon RB, Gooden MD, Sadoun E, Reed MJ. 2003. Inhibited angiogenesis in aging: a role for TIMP-2. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 58: B798-805.
- 5 Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ. 1988. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J Cell Biol* 107: 1589-1598.
- Kuzuya M, Kinsella JL. 1994. Induction of endothelial cell differentiation in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Exp Cell Res* 215: 310-318.
- Maciag T, Kadish J, Wilkins L, Stemerman MB, Weinstein R. 1982. Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol* 94: 511-520.
- 10 Madri JA. 1982. Endothelial cell-matrix interactions in hemostasis. *Prog Hemost Thromb* 6: 1-24.
- Madri JA, Pratt BM. 1986. Endothelial cell-matrix interactions: in vitro models of angiogenesis. *J Histochem Cytochem* 34: 85-91.
- Madri JA, Pratt BM, Tucker AM. 1988. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J Cell Biol* 106: 1375-1384.
- 15 Madri JA, Stenn KS. 1982. Aortic endothelial cell migration. I. Matrix requirements and composition. *Am J Pathol* 106:1 80-186.
- Manoussaki D, Lubkin SR, Vernon RB, Murray JD. 1996. A mechanical model for the formation of vascular networks in vitro. *Acta Biotheor* 44: 271-282.
- Marx M, Perlmutter RA, Madri JA. 1994. Modulation of platelet-derived growth factor receptor expression in microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest* 93: 131-139.
- 20 Merwin JR, Anderson JM, Kocher O, Van Itallie CM, Madri JA. 1990. Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J Cell Physiol* 142: 117-128.
- Montesano R, Orci L. 1985. Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro. *Cell* 42: 469-477.
- 25 Montesano R, Orci L, Vassalli P. 1983. In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol* 97:1648-1652.
- Montesano R, Pepper MS, Orci L. 1993. Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci* 105 (Pt 4): 1013-1024.
- Mori M, Sadahira Y, Kawasaki S, Hayashi T, Notohara K, Awai M. 1988. Capillary growth from reversed rat aortic segments cultured in collagen gel. *Acta Pathol Jpn* 38: 1503-1512.
- 30 Nehls V, Drenckhahn D. 1995. A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and an-giogenesis. *Microvasc Res* 50: 311-322.
- Nehls V, Herrmann R. 1996. The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvasc Res* 51: 347-364.
- 35 Neumann T, Nicholson BS, Sanders JE. 2003. Tissue engineering of perfused microvessels. *Microvasc Res* 66: 59-67.
- Nicosia RF, Bonanno E, Smith M, Yurchenco P. 1994a. Modulation of angiogenesis in vitro by laminin-entactin complex. *Dev Biol* 164: 197-206.
- Nicosia RF, Bonanno E, Villaschi S. 1992. Large-vessel endothelium switches to a microvascular phenotype during angiogenesis in collagen gel culture of rat aorta. *Atherosclerosis* 95: 191-199.
- 40 Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M. 1994b. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 145: 1023-1029.
- Nicosia RF, Ottinetti A. 1990. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 119-128.
- 45 Nicosia RF, Tchao R, Leighton J. 1982. Histotypic angiogenesis in vitro: light microscopic, ultrastructural, and radioautographic studies. *In Vitro* 18: 538-549.
- Nicosia RF, Tchao R, Leighton J. 1983. Angiogenesis-dependent tumor spread in reinforced fibrin clot culture. *Cancer Res* 43: 2159-2166.
- 50 Nicosia RF, Tuszynski GP. 1994. Matrix-bound thrombospondin promotes angiogenesis in vitro. *J Cell Biol* 124: 183-193.
- Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR. 1992. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 67: 519-528.
- 55 Pepper MS, Montesano R, Vassalli JD, Orci L. 1991. Chondrocytes inhibit endothelial sprout formation in vitro: evidence for involvement of a transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* 146: 170-179.
- Rosen EM, Meromsky L, Setter E, Vinter DW, Goldberg ID. 1990. Quantitation of cytokine-stimulated migration of endothelium and epithelium by a new assay using microcarrier beads. *Exp Cell Res* 186: 22-31.
- Sage EH, Vernon RB. 1994. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix: the growth and the glue. *J Hypertens Suppl* 12: 145-152.
- 60 Vernon RB, Angello JC, Iruela-Arispe ML, Lane TF, Sage EH. 1992. Reorganization of basement membrane matrices by cellular traction promotes the formation of cellular networks in vitro. *Lab Invest* 66: 536-547.
- Vernon RB, Gooden MD. 2002. New technologies in vitro for analysis of cell movement on or within collagen gels. *Matrix Biol* 21: 661-669.
- 65 Vernon RB, Lara SL, Drake CJ, Iruela-Arispe ML, Angello JC, Little CD, Wight TN, Sage EH. 1995. Organized type I collagen influences endothelial patterns during "spontaneous angiogenesis in vitro": planar cultures as models of

vascular development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31: 120-131.

Vernon RB, Sage EH. 1999. A novel, quantitative model for study of endothelial cell migration and sprout formation within three-dimensional collagen matrices. *Microvasc Res* 57: 118-133.

5 Villaschi S, Nicosia RF. 1993. Angiogenic role of endogenous basic fibroblast growth factor released by rat aorta after injury. *Am J Pathol* 143:1 81-190.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para crear redes de microvasos perfundibles *in vitro*, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - 5 crear al menos un vaso parental *in vitro* sembrando células endoteliales en y alrededor de al menos un mandril;
 - incluir el al menos un vaso parental en una matriz;
 - añadir estímulos angiogénicos para inducir que el al menos un vaso parental cree brotes en la matriz;
 - extraer el al menos un mandril del al menos un vaso parental después de que el al menos un vaso parental cree brotes en la matriz; y
 - 10 someter el al menos un vaso parental y los brotes a perfusión luminal.
2. Un procedimiento para crear redes de microvasos perfundibles *in vitro*, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - 15 crear al menos un vaso parental *in vitro* sembrando células endoteliales en y alrededor de al menos un mandril;
 - incluir el al menos un vaso parental en una matriz y extraer el al menos un mandril, extrayéndose el al menos un mandril del al menos un vaso parental antes o después de incluir el al menos un vaso parental en la matriz;
 - añadir estímulos angiogénicos para provocar que el al menos un vaso parental forme brotes;
 - y someter el al menos un vaso parental y los brotes a perfusión luminal.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de crear al menos un vaso parental crea al menos dos vasos parentales y los brotes se anastomizan para formar una red microvascular.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de crear al menos un vaso parental comprende crear conjuntos multidimensionales de vasos perfundibles.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el perfundido comprende medio de cultivo celular oxigenado, sin suero, sustancias angiogénicas y sustancias angioestáticas.
6. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de someter el al menos un vaso parental y brotes a perfusión luminal incluye usar un perfundido, incluyendo el perfundido un medio de cultivo celular oxigenado complementado con al menos uno de suero y compuestos que influyen en la angiogénesis.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de someter el al menos un vaso parental y brotes a perfusión luminal incluye perfundir con una solución salina fisiológica oxigenada.
8. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de someter el al menos un vaso parental y brotes a perfusión luminal incluye perfundir con al menos uno de sangre oxigenada, componentes de la sangre y sustitutos de la sangre.
- 35 9. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de someter el al menos un vaso parental y brotes a perfusión luminal incluye perfundir con un perfundido no oxigenado, y se consigue oxigenación del sistema por difusión a través de la matriz.
10. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de someter el al menos un vaso parental y brotes a perfusión luminal incluye añadir al menos uno de compuestos angiogénicos y angioestáticos a un perfundido.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de someter el al menos un vaso parental y brotes a perfusión luminal incluye añadir al menos uno de compuestos angiogénicos y angioestáticos a la matriz.
12. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que las células comprenden células modificadas genéticamente que liberan productos a un perfundido o a la matriz.
13. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la matriz comprende material seleccionado del grupo que consiste en fibrina, colágeno, gelatina, membrana basal gelificada, agar, agarosa, alginato, proteínas de membrana basal, gel de sílice y combinaciones de los mismos.
- 45 14. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de crear al menos un vaso parental comprende además sembrar células de músculo liso y pericitos en y alrededor de al menos un mandril.
15. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la matriz está poblada de células seleccionadas del grupo que consiste en células humanas y células animales.
- 50 16. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que un fragmento de tejido sano o enfermo se incluye en la matriz.

17. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que un fragmento de tejido canceroso se incluye en la matriz.
18. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que un perfundido fluido se desvía a través de la red microvascular reduciendo el flujo a un vaso parental de menor presión y aumentando la resistencia en un vaso parental de mayor presión, de modo que el perfundido se conduzca desde el vaso con mayor presión al vaso con menor presión.
- 5
19. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la red microvascular comprende un microvaso bioartificial o tubos celulares endoteliales permeables.
20. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que las redes microvasculares están comprendidas por células normales o modificadas genéticamente que liberan factores al perfundido.
- 10
21. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa de someter el al menos un vaso parental y brotes a perfusión luminal incluye usar células seleccionadas del grupo que consiste en células normales y células modificadas genéticamente para liberar factores a un perfundido.

FIG. 1A

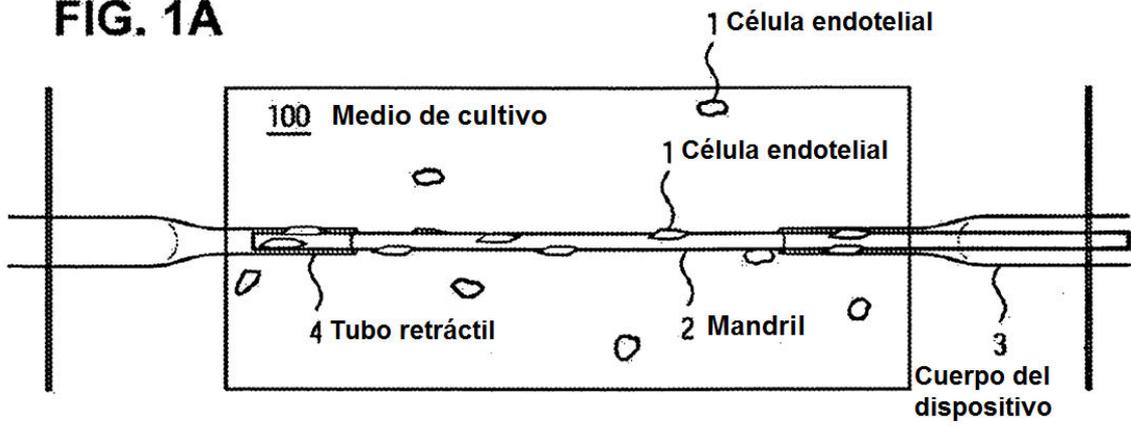


FIG. 1B

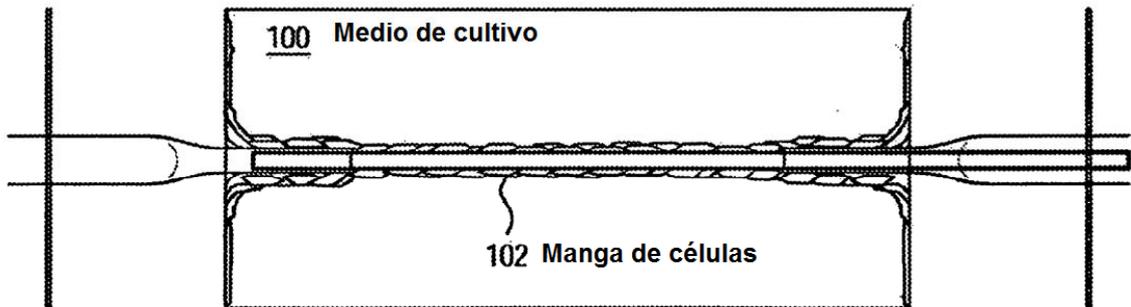


FIG. 1C

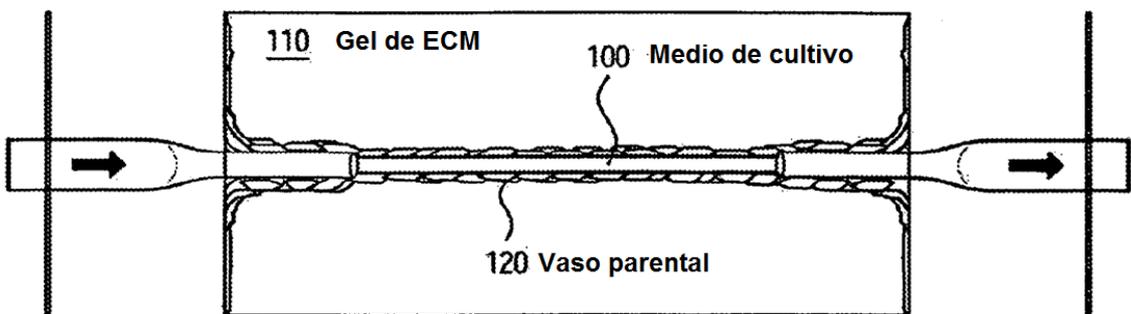


FIG. 2A
(Técnica anterior)

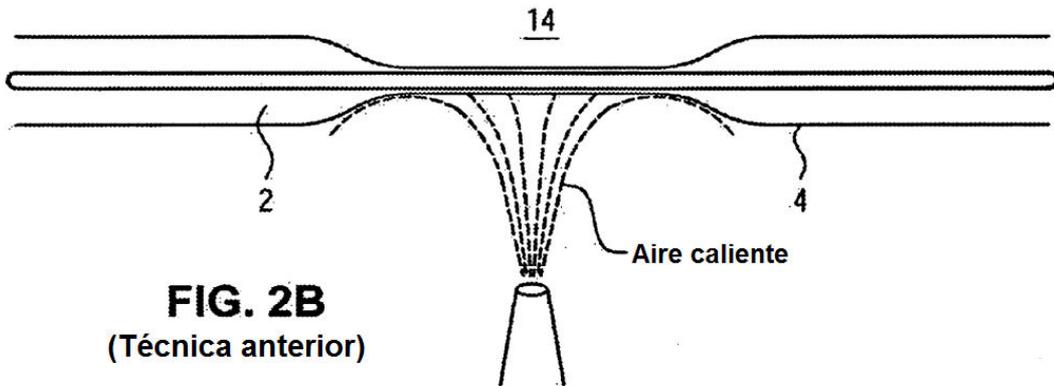
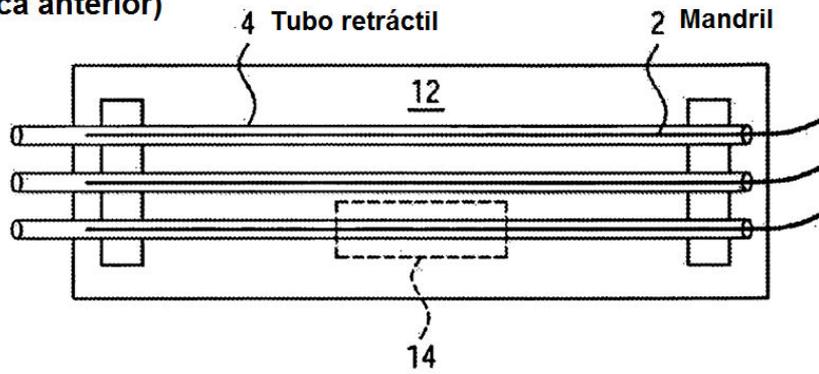


FIG. 2B
(Técnica anterior)

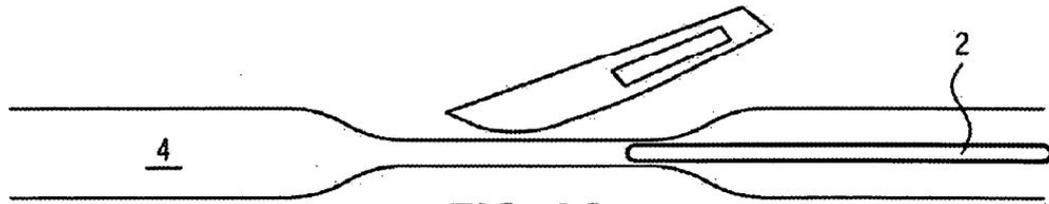


FIG. 2C
(Técnica anterior)

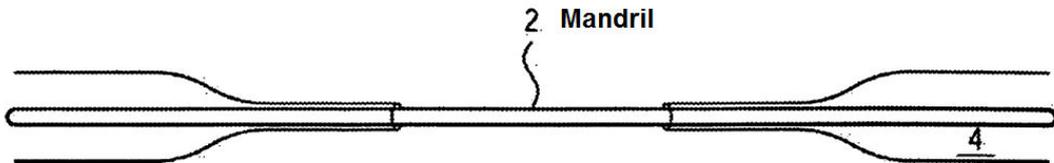


FIG. 2D
(Técnica anterior)

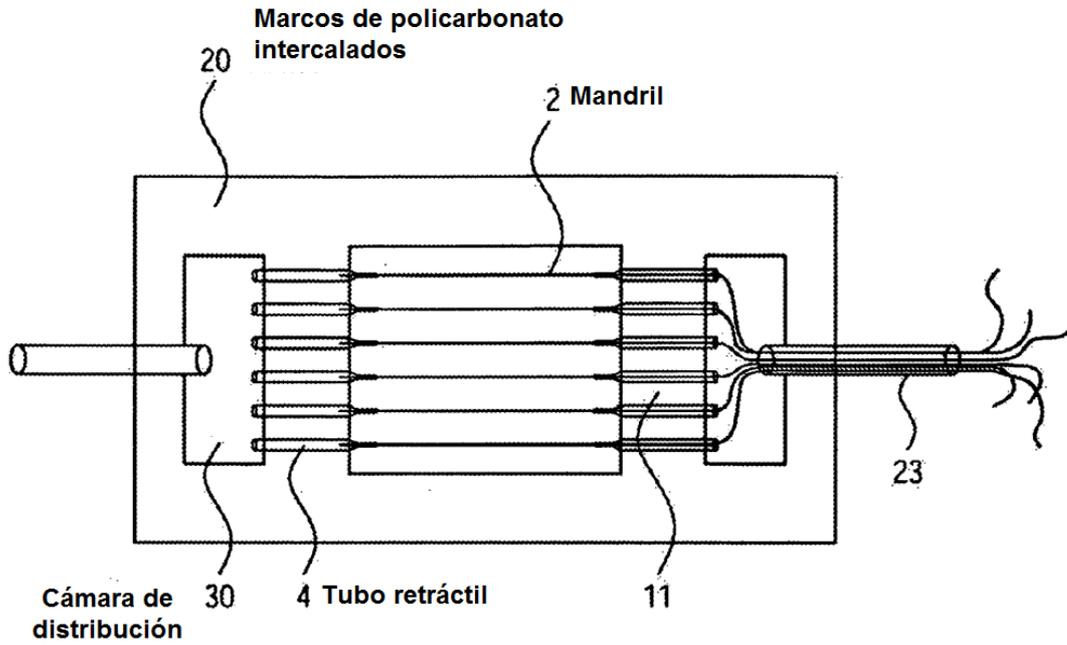


FIG. 3A
(Técnica anterior)

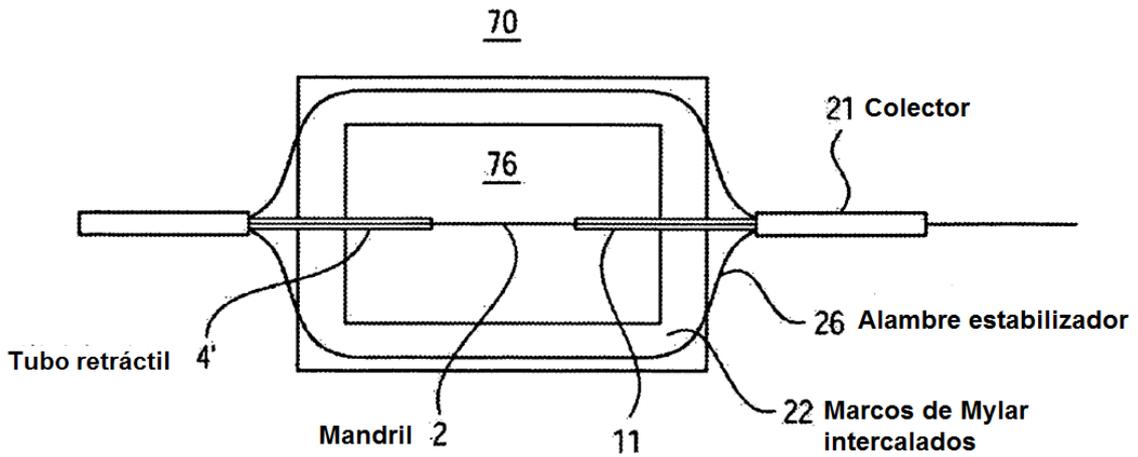


FIG. 3B

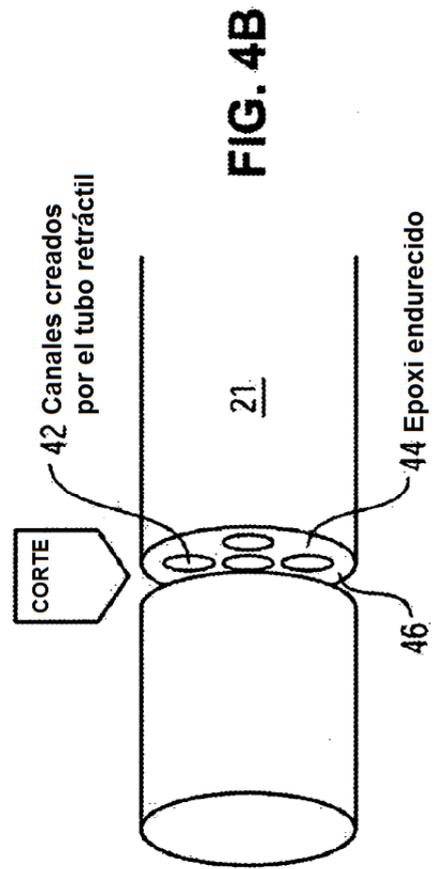
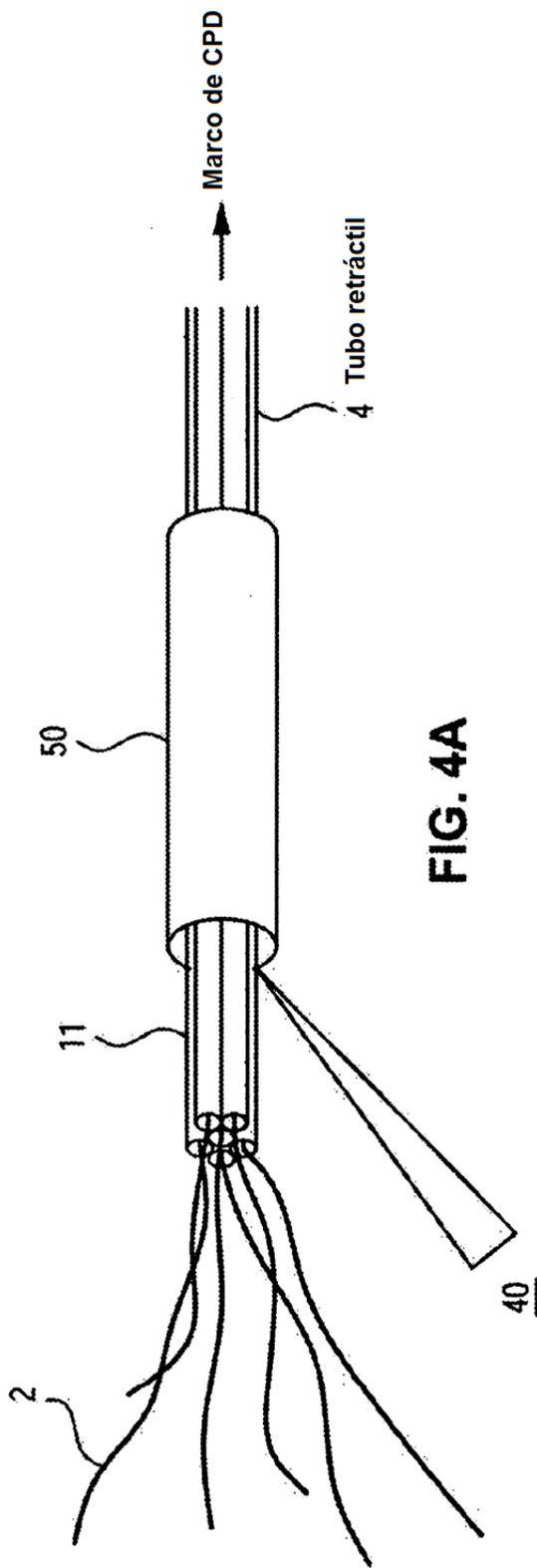


FIG. 5A

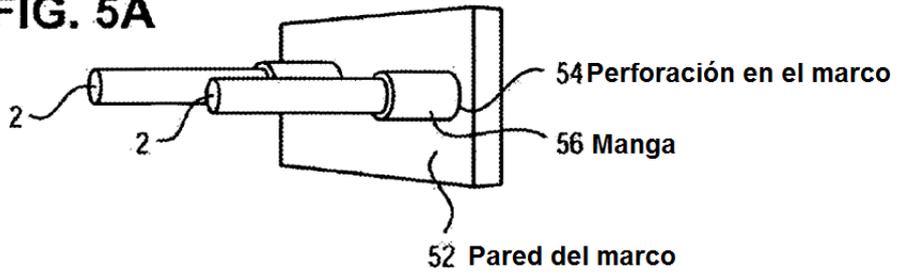


FIG. 5B

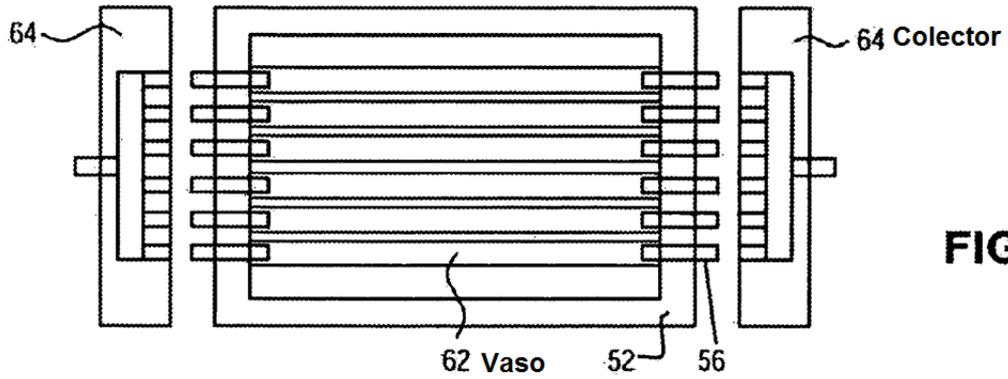
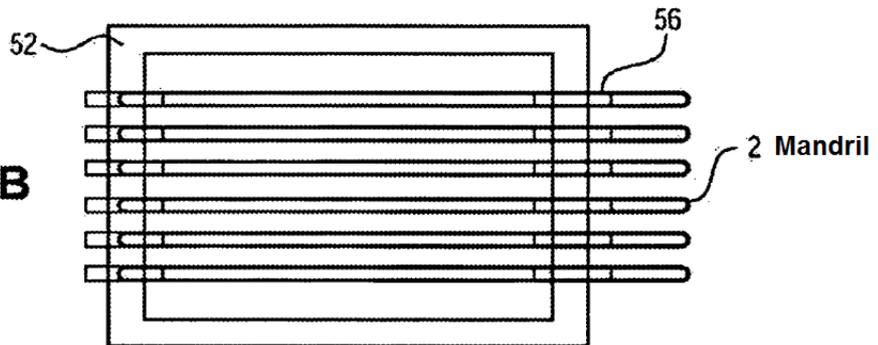


FIG. 5C

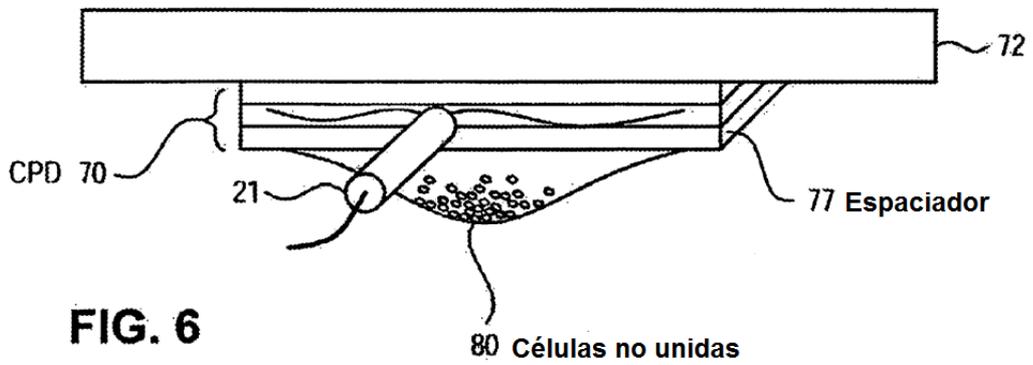


FIG. 6

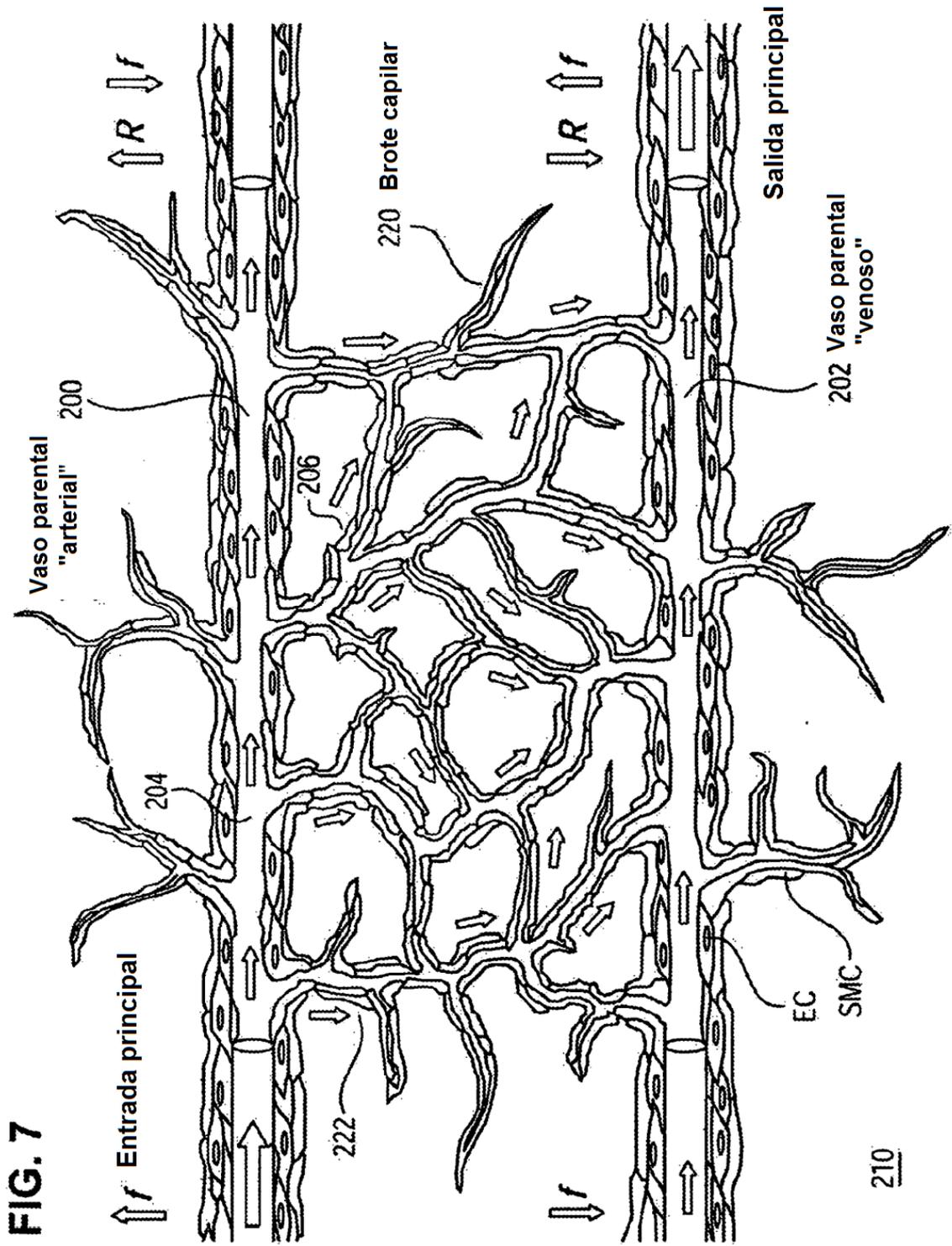


FIG. 7

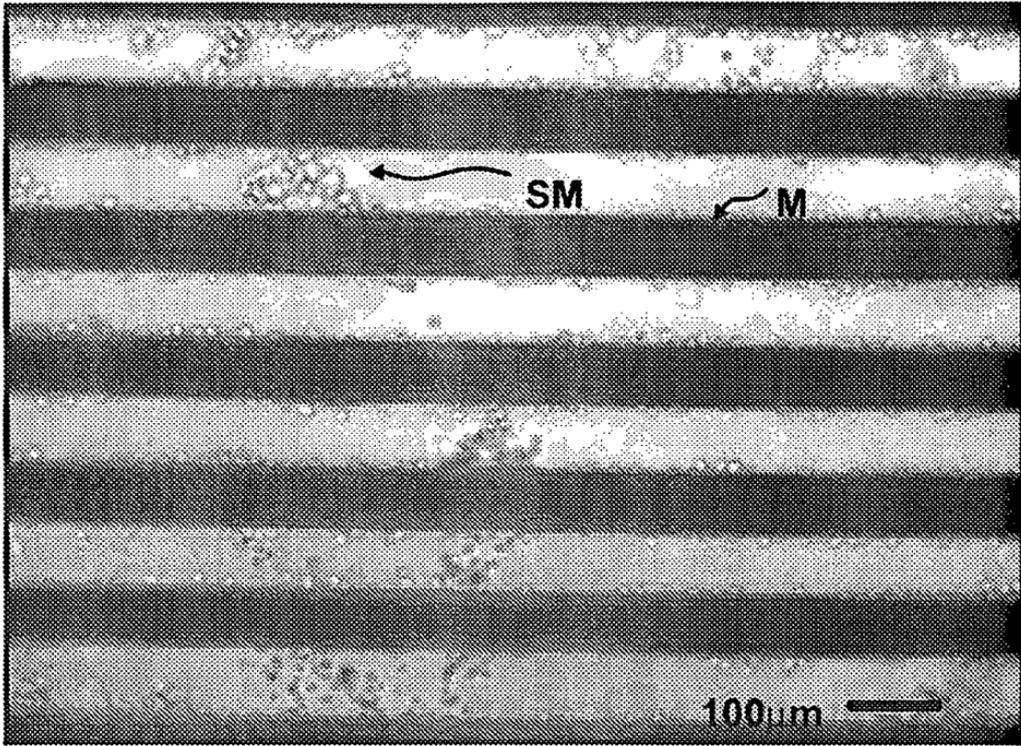


FIG. 8A

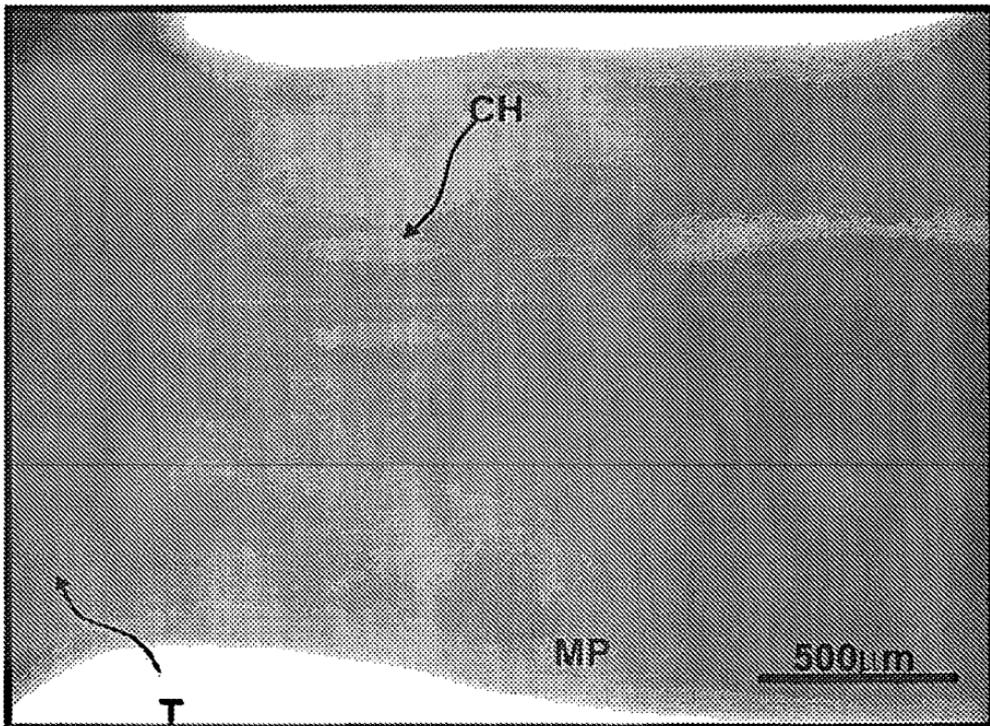


FIG. 8B